

Anwendung voltammetrischer Verfahren in Kopplung
mit der HPLC zur Charakterisierung redoxaktiver
Wirkstoffe

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Irina Rühling
geboren am 31.10.1969 in Hannover

1999

Referent: Herr Prof. Dr. Waldemar Ternes

Korreferent: Herr Prof. Dr. G. Wunsch

Tag der Promotion: 14.07.1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1996 bis Juni 1999 in der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie (ehemaliges Chemisches Institut) des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Ternes durchgeführt.

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. W. Ternes für die interessante Themenstellung, die Anregung und die zahlreichen Diskussionen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Markus und Susanne möchte ich für ihre liebe Unterstützung im Privaten Danke sagen.

Annegret hat für ein erstklassiges Arbeitsklima im Labor gesorgt und durch zahlreiche Gedankenaustausche neue Perspektiven eröffnet. Stefan Schlote danke ich für sein fachübergreifendes Interesse. Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das freundliche Arbeitsklima in unserer Abteilung.

Meinen Eltern und meiner Schwester Ivika möchte ich für die familiäre Unterstützung danken.

Rühling, Irina

Characterization of redoxactive compounds by voltammetric methods coupled with HPLC

Key-words: HPLC, voltammetry, flavonoids

Abstract

The coupling of scanning voltammetric methods with HPLC results in a higher peak purity compared with amperometric detection. Coeluting substances can be separated by different half-wave potentials. Selective detection methods are demanded in the research of functional compounds and contaminants in natural systems. These detection methods should enable the electrochemical characterisation especially of anti- and pro-oxidative substances. The redoxactivity which leads to anti- and pro-oxidative effects can be used for the electrochemical detection of those substances.

The on-line scanning voltammetric detection is demonstrated on a group of herbicides (diquat, paraquat, difenzoquat and ethylparaquat as internal standard). A simultaneous electrochemical analysis of these herbicides had not been possible, up to now. The presented HPLC-method coupled with voltammetric detection allows their electrochemical analysis in one chromatographic run. The detection limits were 8 ng for diquat, 26 ng for paraquat, 22 ng for ethylparaquat and 16 ng for difenzoquat.

A convenient differential-pulse method is presented for simple phenolic compounds which allows the on-line determination of their half-wave potentials. The half-wave potentials is determined on-line for carvacrol and thymol (+ 955 mV) and for p-cymene-2,3-diol (+ 615 mV), vs. Ag/AgCl (3 mol/L KCl).

Another emphasis of this work is the combination of cyclic voltammetry with HPLC. The oxidation products of quercetin and kaempferol are characterized for the first time in preceding experiments carried out in a batch by cyclic voltammetry. The cyclic voltammograms of quercetin in a batch showed four oxidative waves in contrast to published results where only three oxidative signals are described. The cyclic voltammetric detection after HPLC- separation in a stopped-flow modus offered the possibility to use the complex electrochemical behaviour of those flavonoids for their characterisation in mixtures.

Rühling, Irina

Anwendung voltammetrischer Verfahren in Kopplung mit der HPLC zur Charakterisierung redoxaktiver Wirkstoffe

Schlagwörter: HPLC, Voltammetrie, Flavonoide

Kurzzusammenfassung

Aus der Kopplung scannender voltammetrischer Methoden mit der HPLC resultiert eine größere Peakreinheit im Vergleich zur amperometrischen Detektion, da koeluiierende Substanzen über unterschiedliche Halbstufenpotentiale identifizierbar sind. Vor allem bei der Untersuchung funktioneller Inhaltsstoffe und Kontaminanten in lebenden Systemen besteht Bedarf an selektiven Detektionsmöglichkeiten, die gleichzeitig eine elektrochemische Charakterisierung der Zielmoleküle erlauben. Besonders im Bereich der pro- und antioxidativ wirksamen Substanzen wird hier die chemische Eigenschaft, die ihre Wirksamkeit bedingt, nämlich die Redoxaktivität, zur Detektion herangezogen. Die on-line scannende Voltammetrie als elektrochemische Detektionsmethode in der HPLC wurde am Beispiel der Herbizide Diquat, Paraquat und Difenzoquat mit Ethylparaquat als interner Standard demonstriert. Eine parallele Analyse dieser Analyten war mit elektrochemischen Methoden bisher nicht möglich. Die hier vorgestellte Kopplung der Voltammetrie mit der HPLC ermöglichte die parallele elektrochemische Analyse der drei Herbizide mit einem chromatographischen Lauf. Aus den hydrodynamischen Voltammogrammen gingen die Halbstufenpotentiale hervor. Die absoluten Nachweisgrenzen betragen 8 ng für DQ, 26 ng für PQ, 22 ng für EQ und 16 ng für DF.

Für einfache Phenole wurde eine Methode präsentiert, mit der die Halbstufenpotentiale erstmalig on-line nach der HPLC-Trennung bestimmt wurden, sie betragen für Carvacrol und Thymol +955 mV und +615 mV - vs. Ag/AgCl, 3 mol/L KCl - für p-Cymen-2,3-diol.

Innerhalb eines weiteren thematischen Schwerpunktes wurde eine Methode zur Kopplung der HPLC mit cyclovoltammetrischer Detektion entwickelt. Bei den Vorversuchen im Batch wurden die Oxidationsprodukte von Quercetin und Kaempferol erstmalig cyclovoltammetrisch charakterisiert. Quercetin zeigte in den Batch-Versuchen vier oxidative Signale im Gegensatz zu literaturbekannten Cyclovoltammogrammen. Mit der cyclovoltammetrischen Detektion nach der HPLC-Trennung im Stopped-Flow Modus konnte das komplexe elektrochemische Verhalten von Flavonoiden für deren Charakterisierung in Gemischen zugänglich gemacht werden, lediglich das hier beschriebene zusätzliche oxidative Signal des Quercetins war im Stopped-Flow nicht aufzulösen.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	2
3	Grundlagen	4
	3.1 Elektrochemisch analytische Methoden	4
	3.1.1 Übersicht	4
	3.1.2 Ziele	6
	3.1.3 Instrumentelle Aspekte	8
	3.1.4 DC-Voltammetrie und Cyclovoltammetrie	10
	3.1.5 Differentielle Messtechniken	13
	3.2 Kopplungstechniken elektrochemisch analytischer Methoden mit der HPLC	17
	3.2.1 Übersicht	17
	3.2.2 On-line scannende Voltammetrie	18
	3.2.3 Charakteristika der Quecksilberelektroden	22
	3.2.4 Elektrochemische Array-Detektoren	25
	3.2.5 Verfahren zur Entfernung von Luftsauerstoff aus dem analytischen System	28
	3.3 Allgemeine Eigenschaften und Chromatographie der verwendeten Verbindungen	29
	3.3.1 Quaternäre Ammoniumverbindungen	29
	3.3.2 Phenole und Polyphenole, Flavonoide	31
	3.4 Elektrochemie der verwendeten Verbindungen	34
	3.4.1 Quaternäre Ammoniumverbindungen	34
	3.4.2 Phenole und Polyphenole	37

4	Experimenteller Teil	41
4.1	Hydrodynamisch voltammetrische Detektion in der HPLC (HPLC-HDVD)	41
4.1.1	Methodologie	41
4.1.2	Chromatographie und Probenaufarbeitung für die Herbizide	42
4.1.3	Elektrochemische Vorversuche mit den Herbiziden im Batch	45
4.1.4	Optimierung der Durchflußzelle für HPLC-HDVD	55
4.1.5	Optimierung der Steuereinheit für HPLC-HDVD	67
4.1.6	Analyse der Herbizide in Realproben mit HPLC-HDVD	77
4.1.7	Detektion von Thymol, Carvacrol und p-Cymen-2,3-diol mit HPLC-HDVD	83
4.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion	86
4.2	Stopped-Flow und Cyclovoltammetrie	99
4.2.1	Methodologie	99
4.2.2	Elektrochemische Vorversuche mit Flavonoiden im Batch	100
4.2.3	Voltammetrische Messungen der Flavonoide in Kopplung mit der HPLC	105
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion	111
5	Zusammenfassung und Ausblick	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	131
7.1	Abbildungen	131
7.2	Abkürzungen und Formelzeichen	135
7.2.1	Abkürzungen	135
7.2.2	Formelzeichen	137
7.3	Gerätekonfigurationen	138
7.4	Kalibrationen	146

1 Einleitung

Die amperometrische Detektion in der HPLC, wobei Amperometrie ein Spezialfall der Voltammetrie ist, ist eine äußerst leistungsfähige Detektionsmethode zur Analyse organischer Verbindungen bis in den Ultraspurenbereich. Als qualitative Informationen gehen aus einem solchen Chromatogramm die Retentionszeiten der Analyten hervor und eine Aussage darüber, daß die eluierende Substanz bei gegebener Detektorspannung elektrochemisch aktiv ist. Das Halbstufenpotential, bei dem die Redoxreaktion der betrachteten Substanz verstärkt abläuft, geht als wichtiger qualitativer Parameter aus diesen Messungen nicht hervor.

Für die Bestimmung von Halbstufenpotentialen in fließenden Systemen sind prinzipiell zwei Vorgehensweisen denkbar:

- Verwendung scannender Voltammetrie
- Verwendung von Elektrodenarrays

Aus der Kopplung scannender voltammetrischer Methoden mit der HPLC resultiert eine größere Peakreinheit im Vergleich zur amperometrischen Detektion, da koeluierende Substanzen über unterschiedliche Halbstufenpotentiale identifizierbar sind. Die chromatographische Trennung elektrochemisch aktiver Verbindungen ermöglicht darüber hinaus deren voltammetrische Untersuchung, auch wenn sich die Redoxpotentiale überlagern. Mit der Verknüpfung flüssigchromatographischer Methoden mit scannender Voltammetrie ist ein ähnlicher Fortschritt denkbar, wie er durch den Einsatz von Diodenarray-Detektoren gegenüber Detektoren mit fester Wellenlänge möglich war. Vor allem bei der Untersuchung funktioneller Inhaltsstoffe und Kontaminanten in lebenden Systemen besteht Bedarf an selektiven Detektionsmöglichkeiten, die gleichzeitig eine elektrochemische Charakterisierung der Zielmoleküle erlauben. Besonders im Bereich der pro- und antioxidativ wirksamen Substanzen wird hier die chemische Eigenschaft, die ihre Wirksamkeit bedingt, nämlich die Redoxreaktivität, zur Detektion herangezogen.

Bei den voltammetrischen Verfahren unterscheidet man differentielle und lineare Scantechniken. Bei differentiellen Scan-Techniken werden der Spannungsrampe Pulse aufmoduliert und der Strom wird am Fuß des Pulses und während des Pulses gemessen. Der Meßwert ergibt sich aus der Differenz beider Ströme. Bei linearen Scantechniken wird als Meßsignal der Bruttostrom ausgegeben. Die Differenzbildung von Bruttostrom zum Untergrundstrom hat den Vorteil, daß letztere schon während der Messung eliminiert werden. Es gehen aber auch Informationen verloren, so daß für mechanistische und qualitative

Messungen lineare Scan-Techniken, insbesondere die Cyclovoltammetrie bevorzugt werden. Prinzipiell sind beide Methoden mit der HPLC kombinierbar.

Die mögliche Verwendung von Quecksilber als Elektrodenmaterial ist ein Vorteil voltammetrischer Methoden in fließenden Systemen. Quecksilber ist das einzige Elektrodenmaterial, das Arbeitspotentiale bis zu -2 V erlaubt. Analytische Zielgruppe für Messungen an der Quecksilberoberfläche sind demnach Verbindungen, die reduzierbar sind. Das sind potentiell jene Verbindungen, die nach Entfaltung antioxidativer Wirkung in ihrer oxidierten Form vorliegen oder die oxidativ in lebenden Systemen abgebaut worden sind. Zur Isolation dieser Wirkstoffe aus natürlichen Systemen wird in erster Linie die HPLC mit UV-Detektion und nachgeschaltetem, elektrochemischen Detektor verwendet. Diese elektrochemischen Detektoren werden bisher amperometrisch im oxidativen Modus betrieben. Um ein Monitoring auch im reduktiven Bereich durchführen zu können, wird hier ein wichtiges Einsatzgebiet der hängenden Quecksilbertropfenelektrode gesehen. Es sind bereits verschiedene Konzepte von Quecksilberelektroden in Durchflußzellen bekannt, zum Routinebetrieb und konkurrenzfähig in der Nachweisstärke zu spektroskopischen Methoden konnten sie sich jedoch noch nicht durchsetzen.

Der bei einem voltammetrischen Experiment maximal fließende Strom hängt von der lokalen Konzentration des Analyten an der Elektrodenoberfläche ab [1]. Obwohl in der Voltammetrie nur ca. 5 % und in der Coulometrie bis zu 100 % des Analyten umgesetzt werden, kann aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit des Signals die Voltammetrie eine gleiche oder höhere Empfindlichkeit aufweisen als die Coulometrie.

Elektrodenarray-Detektoren können nur mit Festkörperelektroden eingesetzt werden. Zwar bieten die Arrays ebenfalls eine Spannungsauflösung, das Spannungsfenster beschränkt sich auf -1 V bis $+1,3\text{ V}$. Scannende voltammetrische Systeme sind eine preiswerte und leistungsfähige Alternative zu coulometrischen Elektrodenarray-Detektoren: Für die Anschaffung eines 16-Kanalgerätes muß das fünffache Finanzvolumen aufgebracht werden, verglichen mit einem Potentiostaten für die scannende Voltammetrie. Die scannenden voltammetrischen Detektoren sollten mit instrumentellen Komponenten realisierbar sein, die oft in analytischen Laboratorien bereits im Einsatz sind.

2 Aufgabenstellung

Für die scannende, voltammetrische Detektion sollen Gerätekomponenten, wie z. B. der Potentiostat, die Meßzelle und die Steuerungs- und Auswertesoftware hinsichtlich ihrer

Eignung geprüft werden. Die Leistungsfähigkeit on-line scannender Voltammetrie soll anhand der analytischen Parameter Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Linearität der Kalibrierfunktion untersucht werden. Als Testsubstanzen sollen vier quaternäre Ammoniumverbindungen dienen: Die drei Herbizide Diquat, Paraquat und Difenzoquat, sowie Ethylparaquat als interner Standard. Die Wahl dieser gut beschriebenen Verbindungen als Pilotsubstanzen, ermöglicht einen Vergleich der erhaltenen Leistungsmerkmale mit bekannten Verfahren. Es wird erwartet, daß durch Fortschritte in der Mikroprozessortechnik die Voltammetrie um ein vielfaches empfindlicher geworden ist, als die amperometrische Meßtechnik, die 1984 für die Analyse dieser Herbizide verwendet worden war [2].

Die Halbstufenpotentiale der quaternären Ammoniumverbindungen reichen bis zu $-1,4\text{ V}$, was den Einsatz von Quecksilber als Elektrodenmaterial erforderlich macht. Die instrumentellen Voraussetzungen für die Verwendung des hängenden Quecksilbertropfens als Elektrode in fließenden Systemen sind zu optimieren. Für den Einsatz eines hängenden Quecksilbertropfens als Elektrode soll eine speziell für Stripping-Voltammetrie adaptierte Durchflußzelle eingesetzt und ihre Eignung als Detektorzelle für die HPLC geprüft werden. Die Anwendbarkeit der Quecksilberfilmelektrode in der HPLC-Detektion wird überprüft.

Innerhalb eines weiteren thematischen Schwerpunktes dieser Arbeit soll die HPLC mit elektrochemisch analytischen Methoden gekoppelt werden, um das komplexe elektrochemische Verhalten von Flavonoiden für deren Charakterisierung in Gemischen zugänglich zu machen. Die Flavonoide und ihre Oxidationsprodukte zeigen bis zu drei Oxidationsstufen. Um nach einer HPLC-Trennung diese Signale erfassen zu können, sind die Versuchsparameter der Cyclovoltammetrie und die Erfordernisse der Durchflußanalytik einander anzupassen und zu optimieren. Die Übertragbarkeit cyclovoltammetrischer Daten aus Stopped-Flow- und Batch-Messungen ist zu prüfen. Die Einschränkungen, die bei dieser Meßmethode aus der Kopplung mit der HPLC resultieren, sind aufzuzeigen.

3 Grundlagen

3.1 Elektrochemisch analytische Methoden

3.1.1 Übersicht

Die Elektrochemie untersucht Umsetzungen, bei denen die von einer Spannungsquelle gelieferten Elektronen an chemischen Reaktionen teilnehmen [3- 6]. Der elektrische Strom ist dabei Auslöser (Elektrolyse) oder Resultat (galvanische Zelle) der Reaktion. Die Vorgänge bei elektrochemischen Reaktionen lassen sich mit Hilfe elektroanalytischer Methoden untersuchen. Deshalb sind elektrochemische Methoden besonders geeignet, pro- und antioxidative Wirksamkeit von Substanzen zunächst festzustellen und dann die Wirkmechanismen genauer zu untersuchen [7, 8].

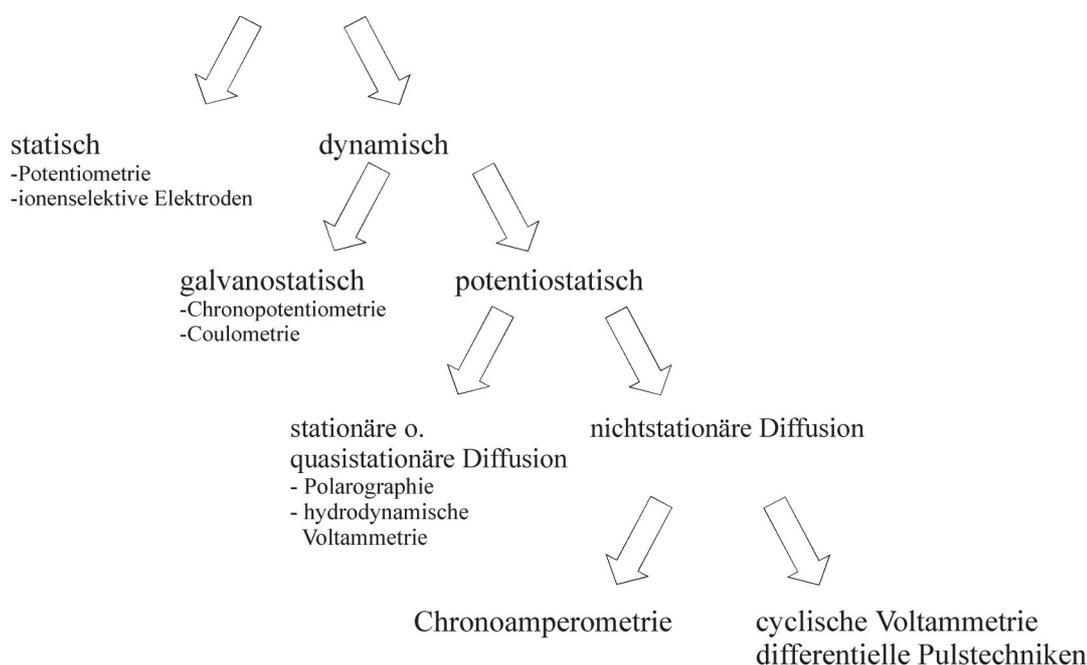


Abb. 3.1: Übersicht über elektrochemisch analytische Methoden

Dieses Kapitel stellt die elektrochemisch analytischen Methoden vor, die sich zu einer Kopplung mit flüssigchromatographischen Trennungen eignen. Abb. 3.1 zeigt eine Übersicht über alle Methoden und ihre Relationen zueinander. *Statische Methoden* messen das Potential, das

sich an einer Phasengrenze zwischen einer Elektrode und einem Elektrolyten einstellt. Den quantitativen Zusammenhang zwischen Potential und Konzentration des betrachteten Analyten liefert das Nernstsche Gesetz, Gl. 3.1:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad (3.1)$$

mit:

E	Elektrodenpotential [V]	z	Anzahl der Elektroden die bei der Reaktion übergehen
E^0	Standardelektrodenpotential [V]	F	Faraday Konstante $9,649 \cdot 10^4 \text{ C/mol}$
R	Allgemeine Gaskonstante, $8,314 \text{ J/(K mol)}$	c_{ox}	Konzentration der oxidierten Form [mol/m ³]
T	Temperatur [K]	c_{red}	Konzentration der reduzierten Form [mol/m ³]

Bei *dynamischen Methoden* wird der Zusammenhang zwischen Potential und Strom betrachtet, einer der beiden Parameter wird im Experiment gezielt verändert und der jeweils andere gemessen. Führt man dieses Experiment mit einem metallischen Leiter durch, erhält man als Ergebnis das Ohmsche Gesetz $I = U / R$, welches den linearen Zusammenhang zwischen Spannung U und Strom I wiedergibt. Aus der reziproken Steigung der Antwortfunktion geht der Ohmsche Widerstand R hervor.

Setzt man eine Elektrolytlösung, in der eine redoxaktive Substanz gelöst ist, für das Experiment ein, ist die Antwortfunktion $I = f(U)$ nicht mehr linear. Den quantitativen Zusammenhang zwischen fließendem Strom und der Konzentration des Analyten gibt das Faradaysche Gesetz, Gl. 3.2:

$$I = z F A J \quad (3.2)$$

mit:

I	Strom [A]
A	Elektrodenoberfläche [m ²]
J	Fluß [mol/(m ² s)]

Die Stromstärke I hängt im Experiment von zwei Teilprozessen ab: Erstens von der Elektrotenübertragung zwischen Depolarisator und Elektrode (heterogene Reaktion) und zweitens

von dem Stofftransport, der dafür sorgt, daß bei der Redoxreaktion umgesetzte Edukte nachtransportiert werden. Für den Stofftransport kommen drei Mechanismen in Frage: Konvektion, Migration (das ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld) und Diffusion.

Direkt an der Elektrode befindet sich die Diffusionsschicht, die vom Depolarisator nur durch Diffusion überwunden werden kann. Die Diffusion ist der langsamste der Transportmechanismen, und deshalb der limitierende Vorgang im Gesamtprozeß. Der maximal fließende Strom wird durch die Diffusion begrenzt. Anhand des Schemas (Abb. 3.1, S. 4) ist erkennbar, daß bei potentiostatischen Methoden die Art der Diffusion entscheidend für die Wahl des theoretischen Modells ist. Wenn die Diffusionsschicht nur wenige Molekülschichten stark ist, was bei starker Konvektion der Fall ist, dann ist sie zeitunabhängig (stationär). Dies gilt bei allen *dynamischen Methoden*, wie z. B. hydrodynamische Voltammetrie und Polarographie. Bei ruhender Lösung ist diese Schicht stark und wächst während des Experimentes in die Lösung hinein (nichtstationär). Das Faradaysche Gesetz muß also um das 1. oder 2. Ficksche Gesetze erweitert werden:

$$\text{Für den stationären Fall:} \quad J = -D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (3.3)$$

$$\text{Für den nichtstationären Fall:} \quad \frac{\partial c}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (3.4)$$

Mit dem Diffusionskoeffizienten $D [m^2/s]$, der Konzentration $c [mol/m^3]$, $x [m]$ als Ortskoordinate, und die Zeit $t [s]$. Diese Überlegungen sind zunächst für alle dynamischen Methoden gültig. Wie die Antwortfunktion $I = f(U)$ exakt aussieht, ist abhängig von der Spannungsvorschubgeschwindigkeit dU/dt .

3.1.2 Ziele

Elektrochemisch analytische Methoden lassen sich prinzipiell auf alle Elemente und Verbindungen anwenden, die sich Redoxreaktionen unterwerfen lassen. Also müßte das gesamte Periodensystem, sowie sämtliche organische Verbindungen Zielgruppen dieser Methodik sein. Das Spannungsfenster, innerhalb dessen gearbeitet werden kann, wird aber durch die Beständigkeit der verwendeten Elektroden und Solventien limitiert. Auch diese besitzen eine Redoxreaktivität. Wenn diese bei geringeren Potentialen einsetzt als die gewünschte analytische Reaktion, erzeugt sie ein hohes, störendes Untergrundsignal. Verfügbare Elektrodenmaterialien und Grundelektrolyten erlauben ein Potentialfenster von ca. -2 V bis +1,3 V.

Tabelle 3.1: Beispiele redoxreaktiver Elemente, Ionen und Verbindungen

Ionen	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$; $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^0$; $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$; $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^0$; $\text{Cr}^{3+}/\text{Cr}^{2+}$; $\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$
Organische Verbindungen	Zucker (Arabinose, Fructose, Glucose), Phenole (Quercetin, Thymol), Aldehyde (Benzaldehyd, Acetaldehyd, Vanillin), Ketone (Aceton, Benzophenon), Nitroverbindungen (Nitrophenol, Pikrinsäure), Nitrosamine, Stickstoffaromaten, Thiole
Komplexe	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; Eisenporphyrine, Ferrocen, Vitamin B_{12} (Co^{2+} als Zentralion)

Trotz der Einschränkungen des Potentialbereiches ist eine Vielzahl organischer Verbindungen, Metallionen, Komplexe und Chelatkomplexe analysierbar. Die oben stehende Tabelle (3.1) gibt einen Überblick über Verbindungen und Elemente, die in diesem Potentialfenster elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktionen eingehen. Funktionelle Gruppen, die bei organischen Verbindungen zur Redoxreaktivität führen sind z. B. OH-, Aldehyd-, Keto-, Nitroso-, SH-Gruppen.

Tabelle 3.2: Aussagen die mit elektrochemisch analytischen Methoden gewonnen werden

Informationen über	Art der Informationen	Methoden
<ul style="list-style-type: none"> funktionelle Gruppen im Molekül Redoxzustände 	Anzahl der Stufen im Voltammogramm	
<ul style="list-style-type: none"> elektrochemischer Prozeß Reaktionsmechanismus Reversibilität Ort der Redoxreaktion im Molekül, Chelatkomplex Kopplung mit chemischen Folgereaktionen 	Zusätzliche Stufen nach dem ersten Zyklus $E_{1/2}$ $E_{1/2} = f(pH)$ z k D	Cyclovoltammetrie Chronoamperometrie Erschöpfende Elektrolyse (Coulometrie) Voltammetrie mit einer rotierenden Ringscheibenelektrode
<ul style="list-style-type: none"> Substanzeigenschaften Elektrodeneigenschaften 		

Die Methoden, die zur Beurteilung pro- oder antioxidativer Wirksamkeit herangezogen werden können, und welche physikochemischen Größen zu der Beurteilung dieser Summenparameter beitragen, sind in der obenstehenden Tabelle zu entnehmen. Hierbei ist $E_{1/2} [V]$ das

Halbstufenpotential, z ist die Anzahl der Elektronen, die pro Molekül übergehen, k die Ratenkonstante und D der Diffusionskoeffizient [m^2/s].

3.1.3 Instrumentelle Aspekte

Die elektrochemisch analytischen Methoden sind in fließenden Systemen und im Batch ausführbar. Prinzipiell werden für potentiostatische Experimente folgende Geräte benötigt:

- Potentiostat: Zur Steuerung der Spannung und Messung des Stromes
- Drei Elektrodenanordnung, bestehend aus:
 - Arbeitselektrode
 - Gegenelektrode
 - Referenzelektrode
- Meßzelle: Als Batch oder Durchflußzelle (letztere werden in Kap. 3.2 beschrieben)
- Auswerteeinheit: Personal Computer (PC)

Zu den Leistungsparametern der *Potentiostaten* für potentiostatische Analysen zählt der Innenwiderstand des Meßgerätes, welcher möglichst hoch sein soll ($10^{15} \Omega$ [5]), die Auflösung und Präzision, welche abhängig sind von der Auflösung des AD-Wandlers und der Stromfenster, die von dem Gerät abgedeckt werden; der Speicherkapazität und der Speicherverwaltung, von der die maximal aufnehmbare Datenmenge abhängt. Die meisten Potentiostaten haben ein ähnliches Leistungsprofil und unterscheiden sich oft anhand der Software, die sich limitierend auf die aquirierbare Datenmenge auswirkt.

Moderne Geräte bieten die Möglichkeit, Daten auf dem *PC* auszuwerten und Ergebnisse dort zu archivieren. Oszilloskope, bei denen Voltammogramme vom Bildschirm abphotografiert oder abgezeichnet werden, sind mittlerweile ebensowenig im Einsatz wie x,t-Schreiber, die bei hohen Spannungsvorschubgeschwindigkeiten zu träge sind. Im Bereich der scannenden Voltammetrie gibt es noch keine professionelle Software, die in der Lage ist, Datenmatrizen aus den Meßdaten zu erstellen und die Versuchsdaten Retentionszeit, Halbstufenpotential und Peakhöhe aus der Datenmatrix zu ermitteln.

Die Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über Materialien der *Arbeitselektroden* und den damit abzudeckenden Arbeitsbereich:

Tabelle 3.3: Elektrodenmaterialien und Arbeitsbereiche

Material	untere und obere Spannungsgrenze [V]
Quecksilber	-2,0 → 0,2
Quecksilberfilm	-1,0 → 0,2
Glaskohle	-0,8 → 1,3
Kohlepaste	-1,0 → 1,3
Gold	-0,1 → 1,0

Die Angaben sind stark vom pH-Wert und vom Solvent abhängig. Die untere Grenze wird durch die Abscheidung von Wasserstoff und die obere Grenze durch die Oxidation des Elektrodenmaterials bestimmt. Der Quecksilberfilm auf einer Glaskohle (glassy carbon, GC) Basis hat eine schlechtere Charakteristik als reines Quecksilber und reines GC. Die Abscheidung eines Quecksilberfilms verringert jedoch den Untergrundstrom bei Potentialen unter 0 V gegenüber einer unbeschichteten GC-Elektrode.

Elektroden aus Edelmetall unterliegen verstärkt der Elektrodenvergiftung, die durch Adsorption von Reaktionsprodukten und Verunreinigungen verursacht wird und die zur Passivierung oder zu erhöhten Untergrundströmen führt. Die Elektrodenvergiftungen bereiten Schwierigkeiten in der quantitativen Analyse, da sie immer auch mit einer Verschlechterung der Empfindlichkeit während der Analyse einhergehen.

Quecksilber wird in Form eines hängenden Quecksilbertropfens (hanging mercury drop, HMDE), als tropfende Quecksilberelektrode (dropping mercury electrode, DME) oder kontrolliert tropfende Quecksilberelektrode (static mercury drop electrode, SMDE) verwendet. Die Verwendung der HMDE fällt unter die voltametrischen Methoden, während die DME und SMDE in der Polarographie verwendet werden. Zur Erzeugung der drei verschiedenen Anwendungsformen dient ein Quecksilbervorratsgefäß aus Plexiglas, das mit einem pneumatisch betriebenen Nadelventil verschlossen wird. Das Quecksilber fließt bei geöffnetem Ventil über eine Glaskapillare mit nur wenigen μm Innendurchmesser aus. Die DME ist während ihrer gesamten Lebensdauer einem Wachstum unterworfen. Die Oberfläche vergrößert sich stetig und damit auch der zur Oberfläche proportionale Strom. Messungen an der DME gehen demzufolge immer mit Oszillationen einher. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde die SMDE entwickelt. Das Ventil ist hierbei nur zu Beginn des Tropfenlebens geöffnet und schließt dann für eine genau definierte Zeit. Der Tropfen wird zum Ende mit einem Hämmerchen von der Kapillare abgeschlagen. Der Strom kann so bei konstanter Tropfenoberfläche gemessen werden.

Die Glaskapillaren sind sehr empfindlich gegenüber mechanischem Streß und gegenüber stark verunreinigten Lösungen. Aber auch in reinen Solventien dringt immer etwas Wasser in die Kapillare ein, was bei niedrigen Potentialen zu einer Wasserstoffabscheidung führt. Das Gas verdrängt den Quecksilberfaden, so daß kein elektrischer Kontakt mehr zwischen Elektrode und Kontrolleinheit besteht. Bei sehr niedrigen Spannungen (-2 V) führt die Wasserstoffentwicklung zu einem verfrühten Verlust des Tropfens. Es wurde versucht, Glas als hydrophoben und somit hervorragend benetzbaren Werkstoff für die Kapillaren durch Kunststoffe zu ersetzen [9]. Diese Entwicklung ist jedoch noch nicht zur Serienreife gelangt.

Als *Gegenelektroden* werden im Allgemeinen Platin- oder GC-Stifte verwendet. Ihre Aufgabe ist es, den Stromkreis zu schließen.

Als *Referenzelektroden* für wäßrige Systeme sind aus historischen Gründen mehrere Redox-Paare im Einsatz: Ag/Ag^+ , Hg/Hg^+ (gesättigte Kalomel-Elektrode, SCE) und $\text{H}_2/2\text{H}^+$. Letzteres Referenzsystem spielt aufgrund seiner schwierigen Handhabung nur eine untergeordnete Rolle. Das Redoxpaar ist über einen Zwischenelektrolyten und ein Diaphragma von der Meßzelle getrennt, so daß Referenz- und Meßsystem sich nicht gegenseitig kontaminieren können. Für nichtwäßrige Systeme wird LiCl gelöst in Ethanol oder Tetrabutylammoniumchlorid in Acetonitril als Zwischenelektrolyt verwendet.

Die *Meßzelle*, in die die Dreielektrodenanordnung eingebracht wird, kann unterschiedlichste Funktionen einnehmen. Heute verwendete Meßzellen für die Batchmessung haben ein Zellvolumen von 10 mL und sind luftdicht abschließbar, inertisierbar, optional temperierbar und mit einem Rührer ausgestattet. In der hydrodynamischen Voltammetrie rotiert eine Scheibenelektrode mit einer genau definierten Frequenz. Für Routineanalysen befinden sich mehrere Batch-Gefäße im Probengeber auf einer drehbaren Plattform oder der Meßstand verfügt, wie bei den Karl-Fischer Apparaturen, über die Möglichkeit, die nicht mehr benötigte Analysenlösung aus dem Gefäß automatisch abzusaugen, zu spülen und erneut zu befüllen. Die Elektroden können auch in Photometerküvetten und spektroskopische Meßzellen eingebracht werden, so daß elektrochemische Reaktionsprodukte direkt spektroskopisch analysierbar sind.

3.1.4 DC-Voltammetrie und Cyclovoltammetrie

Gleichspannungs (DC)-Voltammetrie ist ein Spezialfall der Cyclovoltammetrie. Diese Meßtechniken werden in Kombination mit Festkörperelektroden für mechanistische Analysen angewendet, für quantitative Analysen im Spurenbereich sind sie zu unempfindlich. Der Arbeitsbereich beginnt bei Konzentrationen von etwa 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und die obere Grenze wird durch den *IR*-Abfall in der Lösung limitiert. Der *IR*-Abfall ergibt sich wie folgt: Die

Spannung, die an der Elektrode herrscht (U_{el}), setzt sich zusammen aus der von außen angelegten Spannung (U) abzüglich der am Lösungswiderstand abgefallenen Spannung (IR). Je größer der zur Konzentration proportionale, fließende Strom ist, desto größer ist der Unterschied zwischen der angelegten Spannung und derjenigen an der Elektrode [10]. Die untere Grenze ergibt sich durch den bei kleinen Konzentrationen stärkeren Anteil des kapazitiven Ladestroms [11].

In der Polarographie wurde als erste Spannungsmodulation die DC-Rampe angewendet. Da die Polarographie eine hydrodynamische Methode ist, können hier auch bessere Nachweisgrenzen mit der DC-Technik erzielt werden.

Hier seien die Vorgänge an einer Festkörperelektrode erläutert: Beide Techniken basieren darauf, daß eine Gleichspannungsrampe abgefahren wird, die zunächst unterhalb des Halbstufenpotentials des Depolarisators liegt. Es handelt sich hierbei um eine echte Gleichspannungsrampe oder - wie in den meisten Fällen - um eine stufenförmig modulierte Rampe (stair case). Der Strom, der dabei gemessen wird, ist gering, da Elektrolyte eine gegenüber metallischen Leitern schlechte Leitfähigkeit besitzen. Erreicht die Spannung das Halbstufenpotential, setzt eine Redoxreaktion ein, die zu erhöhtem Stromfluß führt. An der Elektrode wird bei einer Reduktion die oxidierte Spezies an der Elektrodenoberfläche durch diese Reaktion verbraucht. Es entsteht somit ein Konzentrationsgradient, der zu einer Steigerung des Flusses (2. Ficksches Gesetz, Gl. 3.4) und somit des Stroms führt. Es überlagert sich ein zweiter Prozeß: Da die Elektrodenreaktion schnell gegenüber dem diffusiven Nachtransport der oxidierten Spezies ist, wächst der Konzentrationsgradient in die Lösung hinein. Das bedeutet, der Konzentrationsgradient wird flacher. Dieser Umstand führt zu einer Abnahme des Flusses und auch des Stromes. Die Summe beider Vorgänge liefert eine peakförmige Kurve (Abb. 3.2). Der maximal fließende Strom heißt Diffusionsgrenzstrom.

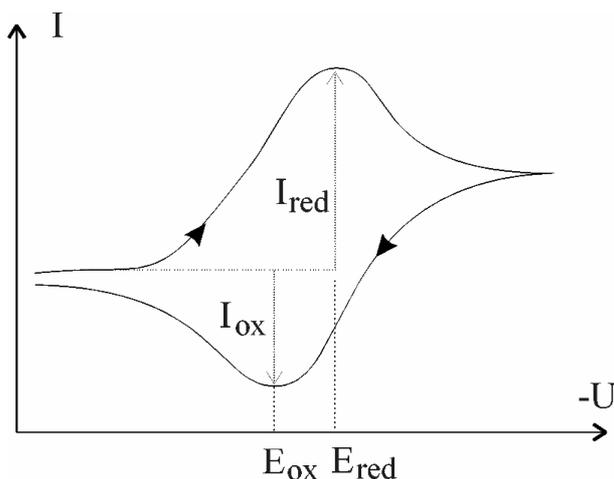


Abb. 3.2: Cyclisches Voltammogramm einer reversiblen, einstufigen Reduktion. Aus der Zeichnung gehen die Peakpotentiale (E_{ox} , E_{red}) und -ströme (I_{ox} , I_{red}) hervor

Das DC-Experiment endet, wenn eine Spannung ca. 300 mV über dem Halbstufenpotential erreicht wurde. Im cyclischen Experiment wird dann der Spannungsvorschub umgekehrt. An der Elektrode liegt überwiegend die reduzierte Form des Analyten vor. Die Spannung befindet sich jetzt also unterhalb des Halbstufenpotentials dieser reduzierten Form. Wird die Spannung wieder gesteigert, erreicht man im Fall einer reversiblen Reaktion das Halbstufenpotential der reduzierten Form und es setzt die Oxidation ein. Auch auf dem Rückwärtsscan wird eine peakförmige Kurve erhalten. Insgesamt ergibt sich eine hysteresartige Funktion $I = f(U)$. Man wird beobachten, daß die beiden Peakpotentiale etwas gegeneinander verschoben sind. Das Halbstufenpotential wird als das arithmetische Mittel aus beiden Peakpotentialen ermittelt.

Das Start-, Umkehr- und Endpotential, die Spannungsvorschubgeschwindigkeit und die Anzahl der Zyklen sind wichtige Versuchsparameter, die variiert werden können. Als Meßergebnisse werden die Peakpotentiale E_{ox} , E_{red} und die Peakströme I_{ox} und I_{red} gewonnen. Mehrere Zyklen können abgefahren werden, um redoxreaktive Produkte aus dem ersten Zyklus an der Elektrodenoberfläche zu detektieren. Die Peakpotentiale und -ströme werden in Abhängigkeit von der Spannungsvorschubgeschwindigkeit gemessen. Anhand dieser Kriterien kann die Reversibilität einer elektrochemischen Reaktion beurteilt und eine Kopplung mit chemischen Folgereaktionen erkannt werden. Diese Kriterien sind numerische Lösungen von Differentialgleichungen, die den Stofftransport des Depolarisators unter Berücksichtigung der Randbedingungen (Strömungsverhältnisse, Reversibilität der Redoxreaktion, Konzentrationen des Polarisators an der Elektrodenoberfläche und in der Bulk-Lösung) wiedergeben [12, 13]. Diese numerischen Lösungen bzw. Kriterien beschreiben die Abhängigkeit der Peakpotentiale und Peakströme von der Spannungsvorschubgeschwindigkeit, für unterschiedliche Rahmenbedingungen existieren, gesonderte Kriterien.

Als Beispiel hier die Kriterien für einen reversiblen Elektrodenprozeß (E_r) mit einer planaren Elektrode in ruhender Lösung :

1. $|E_{ox} - E_{red}| \neq f(v)$ und $\Delta E \approx 58 \text{ mV}$
Die Differenz von 58 mV wird selten beobachtet. Abweichend vom theoretischen Wert findet man oft um 60 - 70 mV erhöhte Werte.
2. $|I_{red} / I_{ox}| = 1$ und $|I_{red} / I_{ox}| \neq f(v)$
3. $I_{vorwärts} = f(\sqrt{v})$

Für den reversiblen Fall kann aus der Auftragung des Peakstromes des Vorwärtsscans $I_p = f(v^{1/2})$ die Steigung abgelesen werden. In die Steigung geht nach Gl. 3.5 der Diffusionskoeffizient $D [m^2/s]$, die Anzahl der übergeladenen Elektronen z , die Elektrodenoberfläche $A [m^2]$ und die Bulk-Konzentration der zu analysierenden Substanz $c [mol/m^3]$ ein. Abhängig davon, welche beiden Parameter schon bekannt sind, kann der dritte aus diesem Experiment bestimmt werden.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 z^{3/2} \sqrt{D} A c \sqrt{v} \quad (3.5)$$

Da die Konzentration genau bekannt sein muß, können diese Aussagen nicht aus cyclischer Voltammetrie in Kopplung mit der HPLC gewonnen werden. Redoxprozesse, die in mehreren Stufen ablaufen, sollten sich jedoch auch in fließenden Systemen nachweisen und interpretieren lassen. Hier stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit von Daten aus dem Batch mit denjenigen im kontinuierlichen Fluß, sowie der Auswirkung der Zellenarchitektur auf die Funktion $I = f(U)$.

3.1.5 Differentielle Messtechniken

Differentielle, potentiostatische Methoden wurden in der Polarographie entwickelt. Der Strom wird hierbei nicht kontinuierlich, sondern in diskreten Messintervallen registriert. In der Tast-Polarographie geschieht dieses gegen Ende eines Tropfenlebens, wenn der Faraday'sche Strom maximal ist und der kapazitive Ladestrom minimal ist. Dadurch kann die Oszillation durch das Tropfenwachstum bei Verwendung einer DME verringert werden. Trotzdem unterliegt die Tast-Polarographie noch hohen Untergrundströmen. Die Methode wurde durch Modulation von Spannungspulsen auf die Gleichspannungsrampe optimiert. Der Puls erfolgt gegen Ende des Tropfenlebens und die Spannung wird am Fuß und auf der Spitze des Pulses gemessen. Die Differenz der beiden Ströme ist das Nettosignal. Pro Tropfen wird einmal gepulst. Die Differenzbildung eliminiert Untergrundströme während der Messung.

Differentielle Messtechniken wurden auf Festkörperelektroden übertragen und sind in dieser Kombination weit verbreitet in der Anwendung. Auch hier ergibt sich eine glockenförmige

Antwortfunktion. Versuchsparameter, die variiert werden können, sind die Pulshöhe und -breite (U_{puls} , t_{puls}), die Pulsfrequenz (f), die Schritthöhe und -weite der Stufen der Treppenstufenrampe (U_{step} , t_{step}). Die beiden letzteren Parameter definieren die Spannungsvorschubgeschwindigkeit $v = U_{step}/t_{step}$. Als weiterer Parameter wird die Meßdauer (t_{mess}) eingestellt

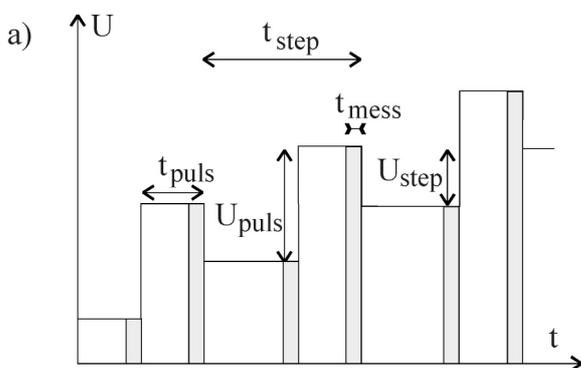


Abb. 3.3.a: Treppenstufen Spannungsrampe mit aufmodulierten Pulsen - Differenzpuls Voltammetrie (DPV). Aus der Abbildung gehen die Stufenweite t_{step} , die Stufenhöhe U_{step} , die Pulshöhe U_{puls} , die Dauer des Meßintervalls t_{mess} und des Pulses t_{puls} hervor.

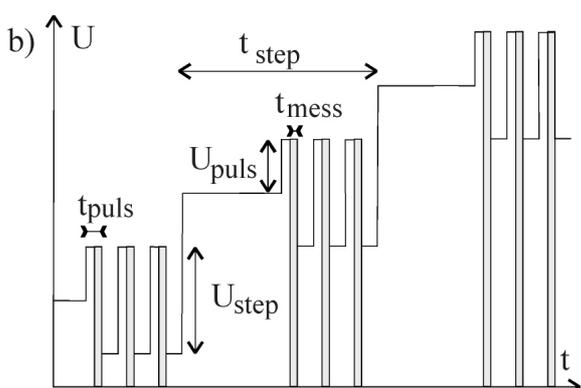


Abb. 3.3.b: Rechteck Voltammetrie (SQWV), Messintervalle = grau hinterlegt

Um das Zustandekommen der Funktion $I = f(U)$ zu erklären, sei zunächst ein polarographisches DC-Tast-Experiment erläutert. Die Spannung befindet sich erst unterhalb des Halbstufenpotentials des Depolarisators. Der fließende Strom ist gering und nimmt trotz steigender Spannung nur schwach zu. Erst im Spannungsbereich des Halbstufenpotentials beginnt der Strom überproportional zu steigen. In der Umgebung der Elektrode verarmt die Lösung an Analyten. Dies hat zur Folge, daß der Strom limitiert wird. Der Konzentrationsgradient dehnt sich aber nicht beliebig weit in die Lösung hinein aus, sondern erreicht einen stationären Zustand. Die sich neu aufbauenden Quecksilbertropfen und auch der Abfall des Tropfens erzeugen eine Konvektion, die den Konzentrationsgradienten konstant hält. Es erfolgt also nach Erreichen des Grenzstromes kein Abfall des Stromflusses. Analog ergibt sich die

S-förmige Stromkurve bei den anderen hydrodynamischen Methoden (Voltammetrie an der rotierenden Scheibenelektrode und Voltammetrie in fließenden Systemen).

Die glockenförmige Antwortfunktion der Differenzpuls-Polarographie (DPP) erklärt sich wie folgt: Das Experiment beginnt bei einem Potential unterhalb des Halbstufenpotentials. Am Fuß eines Pulses findet keine bemerkenswerte elektrochemische Reaktion statt. Auch auf der Pulsspitze wird $E_{1/2}$ unterschritten, es findet ebenfalls keine Reaktion statt, die Differenz der Ströme ist null. Die Spannungsrampe wird gesteigert, bis sich der Fuß des Pulses unter und die Spitze über dem Halbstufenpotential befindet, daß bedeutet der Stromfluß ist unten gering und oben stark, es wird ein differentieller Strom gemessen. Bei einer reversiblen Reaktion findet eine Hin- und Rückreaktion statt. Dieses führt zu einer Erhöhung des Nettostromes gegenüber DC-Techniken. Liegen beide Spannungen des Pulses über dem

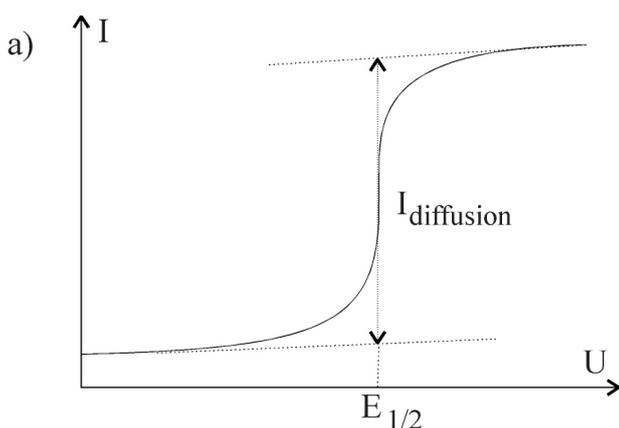


Abb. 3.4.a: Typische Kurvenform $I = f(U)$ in der hydrodynamischen DC Voltammetrie, z. B. Polarographie oder Voltammetrie an der rotierenden Scheibenelektrode. Der Auftragung sind der Diffusionsgrenzstrom ($I_{diffusion}$) und das Halbstufenpotential ($E_{1/2}$) zu entnehmen.

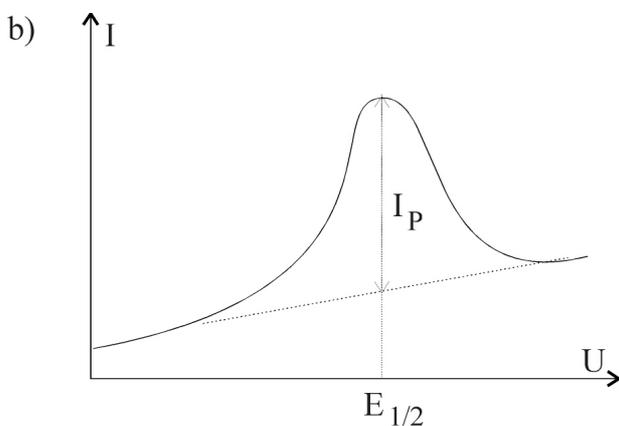


Abb. 3.4.b: Kurvenform mit differentieller Voltammetrie, es geht der Peakstrom (I_P) und das Halbstufenpotential ($E_{1/2}$) hervor.

Halbstufenpotential, fließen auch an beiden Messpunkten hohe Ströme, wobei die Differenz jedoch wieder null ist. Daraus erklärt sich die glockenförmige Stromkurve. Diese Form hat also einen anderen Ursprung als die ähnliche Stromkurve des Cyclovoltammogramms.

Rechteck und Differenzpuls Voltammetrie (SQWV und DPV) unterscheiden sich in ihren theoretischen Ansätzen nicht. Rechteck Voltammetrie bietet wesentlich höhere Modulationsfrequenzen, die bis in den Kilohertz-Bereich reichen, verglichen mit Frequenzen im Hertzbereich bei der DPV. Mit bezüglich der Differenzpuls Technik hohen Frequenzen, aber gegenüber elektronischen Meßverfahren niedrigen Frequenzen, können hier hohe Spannungsvorschubgeschwindigkeiten erzielt werden, die besonders für on-line scannende Voltammetrie in der HPLC gefordert werden. In der Polarographie kann das gesamte interessierende Spannungsfenster während eines Tropfenlebens gescannt werden.

Ein direkter Vergleich von SQWP und DPV kann irreführend sein. Die meisten kommerziellen Differenzpuls-Geräte nehmen den Strom etwa 50 ms nach der Applikation des Pulses auf, das würde einer Rechteck Frequenz von 10 Hz entsprechen, was weit unter dem normalerweise angewendeten Frequenzen liegt. Mathematisch verhalten sich bei diesem Modell die Signal zu Untergrund-Verhältnisse wie 1 : 1,3 (DPV : SQWV) zueinander was einer Empfindlichkeitssteigerung von 30 % gleichkommt. Aus demselben theoretischen Modell leiten Janet und Robert Osteryoung eine Empfindlichkeitssteigerung der SQWV mit 200 Hz gegenüber der DPV von 5,6 : 1 ab [1]. In diese Überlegungen geht die Reversibilität der Elektrodenreaktion ein, bei irreversiblen Reaktionen ist also dieser Vorteil in der Nachweisstärke nicht gegeben.

3.2 Kopplungstechniken elektrochemisch analytischer Methoden mit der HPLC

3.2.1 Übersicht

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über Kopplungstechniken elektrochemisch analytischer Methoden mit der HPLC, deren Informationsgehalt über den der amperometrischen Messungen hinausgeht. Dabei werden neueste Entwicklungen aufgezeigt. Folgende Verknüpfungen zwischen Elektrochemie und Durchflußanalytik sind denkbar:

Tabelle 3.4: Übersicht über Kopplungen elektroanalytischer Methoden mit der HPLC und deren Bewertung hinsichtlich praktischer Aspekte

	Selektivität	Bedarf an Substanzmenge	Zeitaufwand
• On-line scannende Voltammetrie	hoch	gering	gering
• Stopped-Flow Messungen in der Durchflußzelle	hoch	gering	hoch
• Elektroden-Array, amperometrisch / coulometrisch	mittel / hoch	gering	gering
• Mehrfachinjektion einer Probe und Variation der Arbeitsspannung des amperometrischen Detektors bei jeder Injektion [14]	mittel	mittel bis hoch	sehr hoch
• Fraktionierung des HPLC-Eluates und anschließende Batchmessung [15]	mittel oder gering	mittel bis hoch	sehr hoch

Der Substanzbedarf wird als gering eingestuft, wenn spurenanalytische Mengen benötigt werden.

Obwohl vor allem die hydrodynamische Voltammetrie mit Mehrfachinjektion eine zeitaufwendige Technik ist, ist sie zur Bestimmung der Halbstufenpotentiale immer noch weit verbreitet. Die fraktionierte HPLC mit anschließender Batchmessung ist ein Hilfsmittel, wenn die instrumentellen Voraussetzungen zur on-line Messung nicht im Labor vorhanden sind [15].

Instrumentelle Aspekte zur Verwendung von Quecksilberelektroden in fließenden Systemen werden in einem eigenem Kapitel (3.2.3) vorgestellt. Drei Konzepte bestehen für Festkörperelektroden in Durchflußzellen (Abb. 3.5), wobei sich die Wall-Jet Zelle für spurenanalytisches Arbeiten durchgesetzt hat.

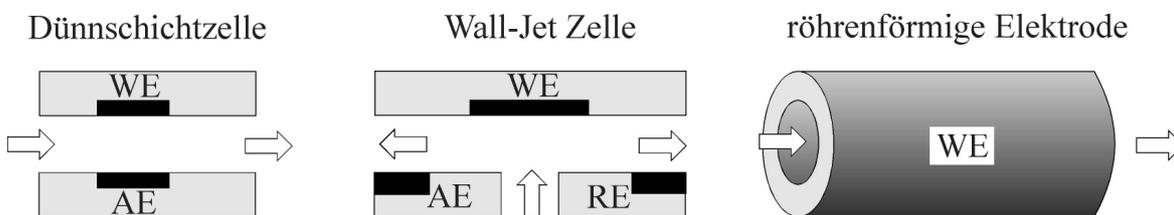


Abb. 3.5: Zellentypen für Festkörperelektroden. WE = Arbeits-elektrode, AE = Gegenelektrode, RE = Referenzelektrode

Der in der Kopplung verwendete Eluent muß bei allen on-line Methoden den Anforderungen an einen Grundelektrolyten für elektrochemische Messungen gerecht werden (Kapitel 3.1). Dieses ist bei Umkehrphasen- und Ionenchromatographie der Fall, während bei Normalphasenchromatographie die Leitfähigkeit des Eluenten zu gering ist und bei aprotischen Solventen etliche Redoxreaktionen vermindert ablaufen können. Dem apolaren Eluent muß ein Leitsalz zugesetzt werden.

3.2.2 On-line scannende Voltammetrie

Die wichtigsten Parameter aller on-line scannender Verfahren sind das Potentialfenster, die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit, gleichbedeutend mit Scangeschwindigkeit, und die Abtastrate. Das Potentialfenster (gegeben durch U_1 und U_2) grenzt den Spannungsbereich ein, innerhalb dessen die voltammetrische Messung abläuft. Die Definition der Scangeschwindigkeit v geht aus Gl. 3.6 hervor:

$$v = \frac{\partial U}{\partial t} \quad (3.6)$$

Die Abtastrate (gleichbedeutend mit Samplingrate) wird durch die Anzahl der Meßpunkte pro Zeiteinheit gegeben. Die Potentialfensterweite und die Scangeschwindigkeit stehen in direktem Zusammenhang mit der Samplingrate bezüglich der Retentionszeit. Wird während einer on-line Messung das Potentialfenster einmal in fünf Sekunden abgefahren, resultiert daraus bei einer bestimmten Spannung eine Abtastrate von $0,2 \text{ s}^{-1}$. Steigert man die Scangeschwindigkeit so, daß das Spannungsfenster innerhalb einer Sekunde abgefahren wird, resultiert eine Abtastrate von 1 s^{-1} . Geht man von einem Gauss-förmigen, chromatographischen

Peak sowie einer minimalen Peakbreite von einer Minute in der Flüssigchromatographie aus, sind mindestens 15 Meßpunkte für eine reproduzierbare Darstellung des Elutionsprofils notwendig [16]. Es errechnet sich hieraus eine minimale Abtastrate bezüglich der Retentionszeit von $0,25\text{ s}^{-1}$. Theoretisch wäre ein Potentialfenster optimal, das den gesamten Spannungsbereich der Arbeitselektrode abdeckt, sowie eine maximale Scangeschwindigkeit und Samplingrate. Die Scangeschwindigkeit kann nicht beliebig hoch gewählt werden: Ist die Scangeschwindigkeit zu hoch bezüglich der Zeitskala der heterogenen Redoxreaktion, wird die Stromausbeute drastisch erniedrigt. Das bedeutet, bei einer gegebenen, elektrochemisch limitierten Scangeschwindigkeit kann die Abtastrate bezüglich der Retentionszeit nur über die Weite des Potentialfensters variiert werden. Je kleiner das Potentialfenster jedoch gewählt wird, desto geringer wird die qualitative Information, die während eines chromatographischen Laufes gewonnen werden kann. Erfahrungsgemäß müssen mindestens 400 mV abgetastet werden um einen Redoxvorgang voltammetrisch voll zu erfassen. Die Samplingrate bezüglich der Spannungsachse wird durch die instrumentelle Leistungsfähigkeit limitiert, bei modernen Geräten ist dieses gleichbedeutend mit der Frequenz mit der das analoge Signal digital gewandelt werden kann. Bevor sich die Analog-Digital-Technik in Laboratorien etablierte, war die Samplingrate gleichzusetzen mit der Trägheit, mit der ein Aufzeichnungsgerät (Schreiber oder Bildschirm) auf das Meßsignal reagierte. Die maximal wählbare Samplingrate hängt aber auch von dem Arbeitsspeicher (RAM) und von der sonstigen Architektur des datenverarbeitenden Systems ab.

Die Modulation der Spannungsrampen kann unterschiedliche Formen annehmen. Als einfachste Form findet die Treppenstufen Voltammetrie, bzw. DC-Voltammetrie ihre Anwendung [17-20]. In fließenden Systemen, sowie in Batch- Systemen werden hier meist S-förmige Voltammogramme erhalten. Die Selektivität ist gegenüber der amperometrischen Detektion geringfügig erhöht, da zwei sich überlagernde stufenförmige Signale nur schwer getrennt interpretierbar sind.

Cyclische Voltammetrie und DC-Techniken

Gunasingham und Mitarbeiter realisieren eine Kopplung von cyclischer Voltammetrie mit HPLC [21]. Die Analyten p-Benzochinon, 9,10-Phenanthrenchinon und 9,10-Anthrachinon wurden mit Normalphasenchromatographie getrennt. Dem Eluenten wurde 0,1 mol/L Tetra-butylammoniumfluoroborat als Leitsalz zugesetzt und die Analyten wurden mit Hochgeschwindigkeits-Cyclovoltammetrie detektiert. Die Verwendung apolarer Solventien wird hier mit der Reproduzierbarkeit der Untergrundkorrektur begründet. Die detektierten Analytmengen betragen 10 bis 20 µg. Als Detektorzelle fungierte eine großvolumige Wall-Jet Zelle (Abb. 3.5), bei der der Abstand zwischen Einlaß in den Detektor und Arbeitselektrode 10 mm beträgt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 mL/min. Mit

Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten von 0,6 bis 2,5 V/s gehen aus den Cyclovoltammogrammen die verschiedenen Oxidations- und Reduktionsstufen der Chinone deutlich peakförmig hervor. Diese Methode ist also wenig sensitiv aber sehr selektiv. Ein Vergleich zu cyclovoltammetrischen Messungen im Batch wird nicht gegeben. Auch Ploegmakers und Mitarbeiter berichten von cyclischer Voltammetrie an einer Glaskohle Elektrode (\varnothing 3 mm), sowie an einer HMDE als on-line Detektionsmethode in der HPLC [22, 23]. Auch hier ist der Abstand zwischen Zufluß und Elektrodenoberfläche justierbar, auf eine Angabe des Abstands wird verzichtet.

Die theoretischen Hintergründe cyclischer Voltammetrie in fließenden Systemen und kleinvolumigen Zellen sind äußerst komplex: Das Zellvolumen und die Strömungsverhältnisse in der Detektorzelle sind von größter Wichtigkeit und ausschlaggebend für den theoretischen Ansatz, mit dem die elektrochemischen Reaktionen beschrieben werden können. Wenn der Abstand zwischen Arbeitselektrode und Zufluß des Eluenten (Eingang des Detektors) sehr gering ist, folgt die Wall-Jet Zelle theoretisch und experimentell dem einer Dünnschichtzelle [24, 25].

Für eine reversible Reaktion unter Dünnschicht-Bedingungen gilt für den Peakstrom [5]:

$$I_p = \frac{z^2 F^2 v V c}{4RT} \quad (3.7)$$

und für eine total irreversible Reaktion:

$$I_p = \frac{z \alpha z_a F^2 V v c}{2,781 RT} \quad (3.8)$$

mit:

z	Anzahl der Elektronen, die pro Molekül insgesamt übergehen
z_a	Anzahl der Elektronen, die beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt übergehen
F	Faraday Konstante; $9,6485 \cdot 10^4$ C/mol
v	Scangeschwindigkeit [V/s]
V	Volumen [m^3]
c	Konzentration in der Bulk-Lösung [mol/m^3]
R	Allgemeine Gaskonstante; $8,314$ J/(K mol)
α	Transferkoeffizient

Bei beiden Reaktionstypen ist der Peakstrom direkt proportional zur Scangeschwindigkeit, die Flußrate geht nicht ein. Mit größerem Abstand zwischen Elektrode und Zufluß nimmt der Wall-Jet Charakter der Messzelle zu. Für ein Wall-Jet Verhalten gelten dann teilweise die Bedingungen hydrodynamischer Voltammetrie, wie z. B. an rotierenden Scheibenelektroden. Die mathematische Beschreibung der Grenzverhalten kann dann nicht angewendet werden.

Rechteck Voltammetrie

Als bisher in Empfindlichkeit und Selektivität unübertroffene Spannungsmodulation ist die Rechteck Voltammetrie zu nennen. Osteryoung und Mitarbeiter veröffentlichten 1980 die erste Arbeit mit scannender voltammetrischer Detektion [26]. Die Nachweisgrenze für Nitrosodiethanolamin wird mit 80 ng und von N-Nitrosoprolin mit 86 ng (pro Injektion) angegeben. Der Linearitätsbereich überspannte eine Zehnerpotenz und die Reproduzierbarkeit für Mehrfachinjektion lag bei 1 %. Die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit betrug 250 mV/s, das Startpotential betrug -0,81 V, das Endpotential betrug -1,2 V. Das chromatographische System basierte hier auf Umkehrphasenchromatographie. Ein weiteres Beispiel für Rechteck-voltammetrische Detektion in der HPLC bieten Owens und Sturrock [27]. Hier wurden die Pestizide Simazin, Atrazin, Cyanazin und Propazin chromatographisch getrennt und mit Nachweisgrenzen von 0,26 bis 0,37 ng (pro Injektion) detektiert. Beide Publikationen bieten keine Vergleichsmessungen mit den Depolarisatoren im Batch, so daß nicht klar wird, ob der deutliche Fortschritt in der Nachweisstärke auf die Wahl der Analyten oder auf die Optimierung der instrumentellen Bedingungen zurückzuführen ist. Für eine Reihe von Nitrophenolen wird eine Nachweisgrenze von 0,25 ng angegeben [28], jedoch hängt die Nachweisgrenze davon ab, wie die Datenmatrix ausgewertet wird, die Auswertung wird durch Anwendung der Faktoranalyse optimiert [29]. Als abschließendes Beispiel für Rechteck-voltammetrische Detektion sei die Analyse von Radiosensitizern erwähnt, bei der Nachweisgrenzen im unteren µg-Bereich erreicht wurden [23].

Alle bekannten Applikationen für Rechteck Voltammetrie wurden an der SMDE realisiert.

Andere Pulstechniken

Weiterhin werden Meßtechniken verwendet, bei denen der gleichbleibenden Arbeitsspannung Pulse identischer Höhe (gepulste Amperometrie) [30-32] oder Pulse mit stetig wachsender Pulshöhe [33] aufgesetzt werden. Diese Techniken sind dann sinnvoll, wenn das Halbstufenpotential der zu untersuchenden Substanzen auf halber Höhe der Pulse liegen. Die optimale Höhe eines Pulses für eine reversible Reaktion errechnet sich aus $50 mV/z$, wobei z die Anzahl der Elektronen ist, die pro Molekül umgesetzt werden [1]. Daraus folgt, daß die

amperometrischen Pulstechniken nur dann effektiv sind, wenn die Halbstufenpotentiale der Analyten dicht beieinander liegen. Der Selektivitätsgewinn gepulster Amperometrie ist demzufolge gering gegenüber der Amperometrie.

Vanderberg und Johnson stellen zwei Pulstechniken vor [34]: Pulsed electrochemical Detection (PAD) und Integrated Voltammetric Detection (IVD). Die amperometrische Detektion wurde bei der PAD durch Anlegen sehr schneller Pulse zur oxidativen Reinigung und reduktiven Aktivierung der Elektrodenoberfläche modifiziert. Bei der IVD werden mit Scangeschwindigkeiten von 5 V/s sehr schnelle Dreieckspulse angelegt, deren integrierte Ströme den chromatographischen Meßwert darstellen. Durch die Integration geht jedoch die aus der Cyclovoltammetrie erhältliche qualitative Information verloren. Die Selektivität wird mit dieser Methode nicht erhöht. Die hier erreichte Empfindlichkeit für Cystein, Cystin und Glutathion ist gering.

3.2.3 Charakteristika der Quecksilberelektroden

Für den Einsatz von Quecksilber als Elektrodenmaterial gibt es hauptsächlich vier Konzepte:

- Hängender Quecksilbertropfen (HMDE) [28, 31, 35-41]
- Tropfende Quecksilberelektroden, als frei tropfende Elektrode (DME) oder kontrolliert tropfende Elektrode (SMDE) [26, 27, 29, 30, 32, 42-46]
- Bubble Elektrode [47]
- Quecksilberfilmelektrode

Quecksilberfilmelektroden

Für die Verwendung einer Quecksilberfilmelektrode in der HPLC gibt es bisher wenig Applikationen, während die Verwendung in der Fließinjektionsanalyse und bei elektrochemischen Stripping Verfahren weit verbreitet ist [48-53]. In der Wall-Jet Zelle trifft ein feiner Strahl des Eluenten auf die Mitte des auf der Scheibenelektrode aufgebrachtene Quecksilberfilms und verteilt sich radial auf der Oberfläche. Die Hydrodynamik ist wohldefiniert und führt zu einer sehr hohen Empfindlichkeit [54]. In Durchflußsystemen kann der Film komfortabel aufgebracht werden, indem man zunächst eine Hg^{2+} Lösung bei der Abscheidungs-spannung von Hg durchfließen läßt und dann den Elutionsstrom von der HPLC Säule einkoppelt. Der Nachteil des Quecksilberfilms in der HPLC-Analytik besteht in der hier geforderten Langlebigkeit der Elektrode. Der Film unterliegt in einer Wall-Jet Zelle einer

hohen mechanischen Belastung durch hohe lokale Flußraten, und allgemein der Gefahr der Kontamination, Passivierung und Vergiftung, besonders bei hoher Matrixbelastung.

HMDEs und tropfende Quecksilberelektroden

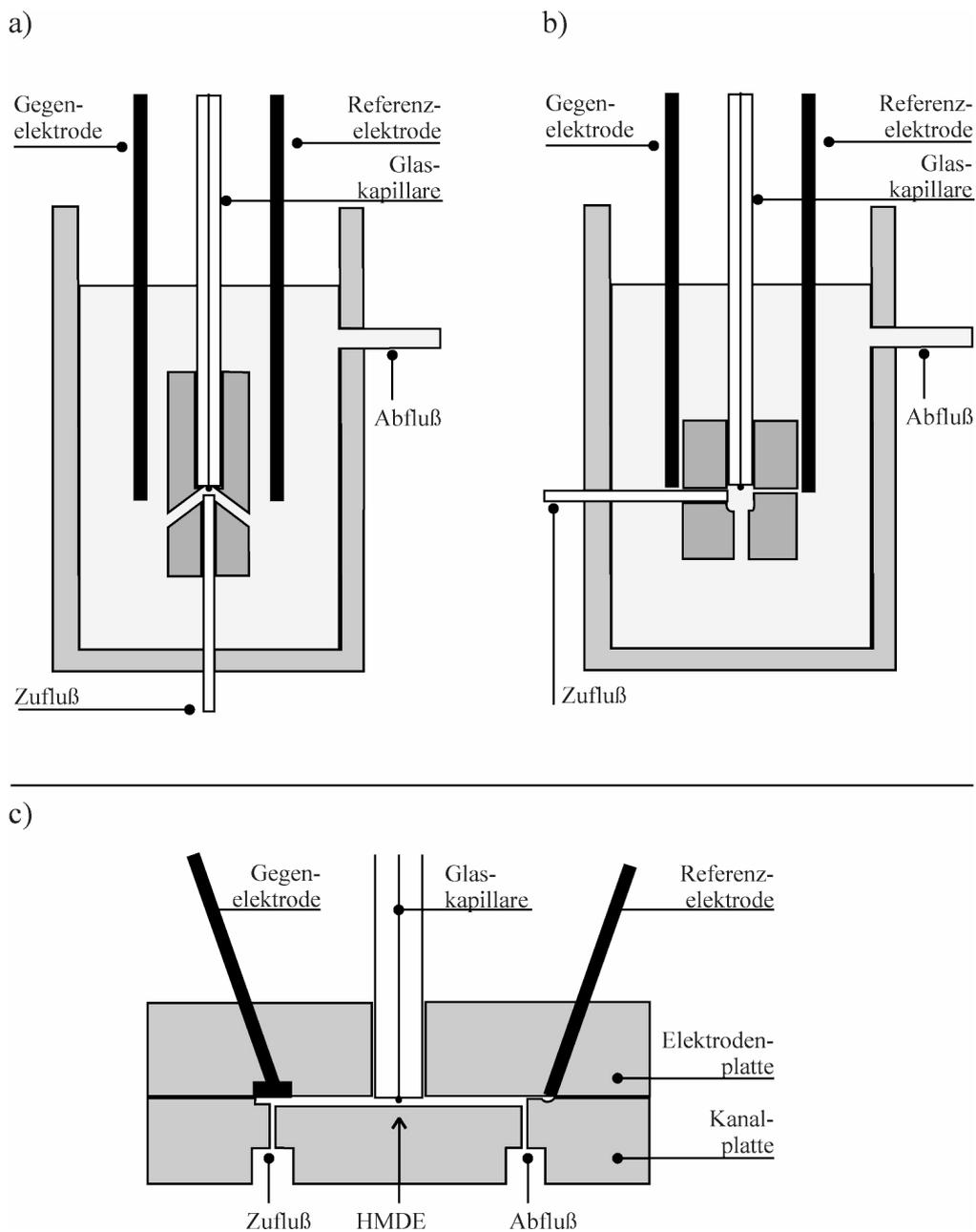


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Durchflußzellen für Quecksilberelektroden (a und b: Offene Bauweise; c: Geschlossene Bauweise)

Die Abbildungen 3.6.a und b zeigen die zwei meistverwendeten Detektorzellen für den Einsatz von HMDEs, SMDE und DME [47]. Die Halterung für die Zuflußkapillare wird meistens selbst hergestellt und kann in marktübliche voltammetrische Meßstände eingebaut werden. Der Abstand zwischen Kapillarenöffnung und Quecksilbertropfen ist justierbar, wobei die Justage nur mit größter Vorsicht und Sorgfalt möglich ist. Die offene Zellarchitektur erlaubt einen problemlosen Abtransport des Quecksilbers wenn der Tropfen erneuert wird.

Der Electrochemical Flow Through Trace-Analyzer (EFTA) ist eine Durchflußzelle (Abb. 3.6.c), die bezüglich Zellvolumen, Totvolumen, und Strömungsverhältnisse gegenüber den offenen Zelltypen optimiert wurde und bisher in der elektrochemischen Stripping Analyse mit der HMDE angewendet wurde [35]. Bei dieser Analysemethode wird die Analysenlösung mittels pulsationslosen Kolbenbüretten zunächst durch die EFTA gepumpt. An der HMDE wird der Analyt elektrochemisch abgeschieden. Nach der Anreicherungsphase kann ein Medienwechsel erfolgen z. B. zu einem Puffer, in dem sich der Analyt begünstigt abstreifen (stripping) läßt. Nach dem Spülen der Zelle mit Puffer wird der Analyt zur Messung im ruhenden Medium wieder in Lösung gebracht. Da die EFTA eine Durchflußzelle ist, bei der in stehender Lösung gemessen wird, muß sich ihre Eignung als HPLC-Detektorzelle erst noch erweisen.

Bubble Elektroden

Bubble Elektroden bestehen aus einem mit Quecksilber gefüllten Gefäß, welches als Arbeitselektrode fungiert, in das der Eluent mit feinem Strahl von unten eingespeist wird. Die Referenz- und Arbeitselektrode sind Drähte aus Silber und Platin. Sie befinden sich in der Zuflußkapillare. Der Eluent bildet Tropfen in dem Quecksilbervorrat, welche nach oben steigen, wo sich der Abfluß befindet. Mit dieser Technik werden Probleme mit der Stabilisierung von flüssigem Quecksilber in einer umgebenden, strömenden Flüssigkeit umgangen. Die einfache Konstruktion kann in die üblichen, voltammetrischen Meßstände montiert werden. Die darin enthaltenen Abschlagmechanismen werden auch hier zur Erzeugung gleichmäßiger Blasenbildung genutzt. Die hohe Zeitkonstante des Detektors wirkt sich bei diesem Zelldesign nachteilig aus.

3.2.4 Elektrochemische Array-Detektoren

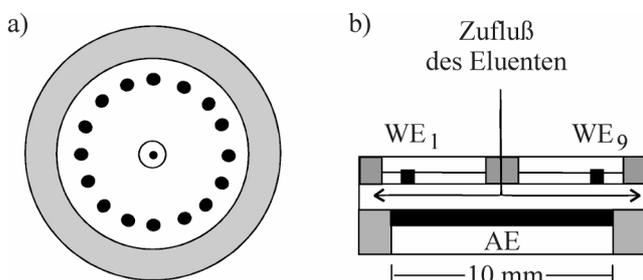


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des amperometrischen Array-Detektors nach Hoogvliet [55], (Abb. 3.7.a: Elektrodenplatte von oben betrachtet, Abb. 3.7.b: Querschnitt, WE = Arbeitselektrode, AE = Gegenelektrode). Die Referenzelektrode ist außerhalb dieses Gehäuses platziert.

Elektrochemische Array-Detektoren können amperometrisch und coulometrisch betrieben werden. In der amperometrischen Technik wird an jede Elektrode ein konstantes Potential angelegt und der resultierende Strom in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Hoogvliet und Mitarbeiter entwarfen einen amperometrischen 16-fach Array-Detektor, Abb. 3.7. Die Elektroden werden parallel angeströmt. Für Epinephrin konnte eine Nachweisgrenze von 0,1 pg erreicht werden, die Selektivität wurde jedoch gegenüber einem amperometrischen Detektor mit einem Kanal nicht erhöht [55]. Wenig später stellten Fielden und Mitarbeiter mehrere amperometrische Arrays verschiedener Bauart vor. Es traten hier Probleme auf die potentiostatische Kontrolle über das Array aufrecht zu erhalten [56]. Insgesamt ist die Zahl der Literaturquellen für amperometrische Multi-Elektrodenarrays gering [57-59].

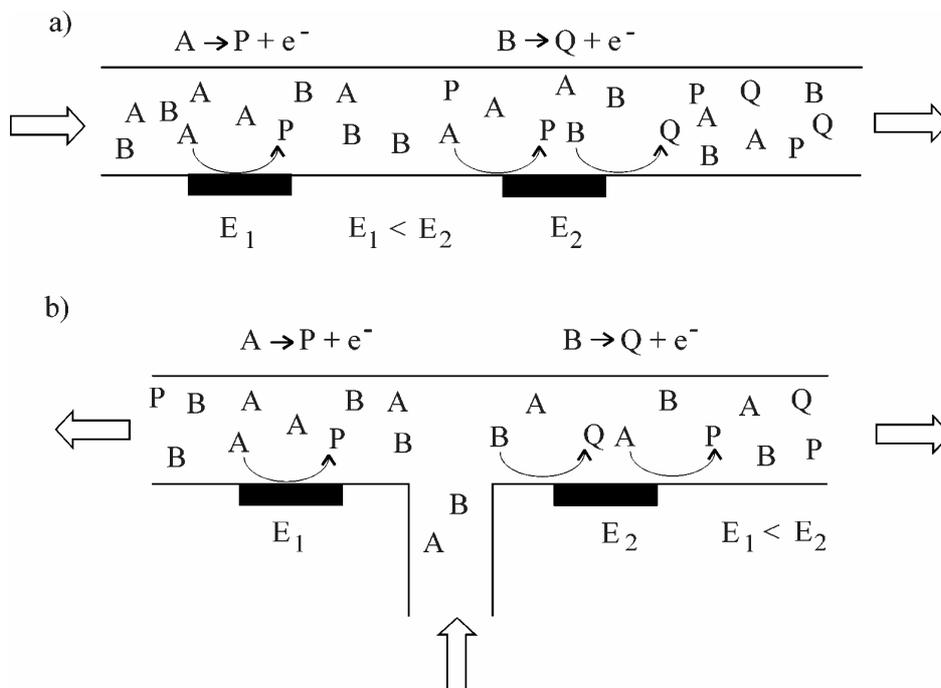


Abb. 3.8: Schematische Darstellung eines oxidativ arbeitenden amperometrischen Elektrodenarrays, Reihenschaltung (a) und Parallelschaltung (b)

Die chemische Entfernung einer Substanz A, die mit B koeluiert, geschieht, indem Substanz A mit dem niedrigeren Halbstufenpotential an der Elektrode E_1 vollständig umgesetzt wird (Abb. 3.9). Die Verbindung B kann an der Elektrode E_1 nicht reagieren, da ihr Halbstufenpotential dort unterschritten wird. Gelangt der Elutionsstrom zu der Elektrode E_2 befindet sich nur noch B in Lösung, sowie das Produkt P aus der ersten Elektrodenreaktion, welches sich in diesem Beispiel inert gegenüber der Elektrode E_2 verhält. Die einzige Reaktion, die an der Elektrode E_2 stattfindet, ist also die Umsetzung von B zu Q. Auf der Spannungsachse im resultierenden Chromatogramm werden die Signale von A und B aufgelöst, die Peakreinheit wird deutlich erhöht. Es ist also erforderlich, daß der Elutionsstrom die Elektroden nacheinander passiert und die Arbeitsspannung an der ersten Elektrode am niedrigsten ist und sich dann steigert. In den coulometrischen Zellen werden hochporöse Graphit-Elektroden verwendet, die durchflossen werden. Trotz dieser Oberflächenvergrößerung sind auch an der letzten Elektrode keine Peakverbreiterungen und keine störenden Totvolumina zu erkennen [61-64]. Die Verweilzeit einer Substanz, die an der ersten und letzten Elektrode detektiert werden kann, ist so gering, daß die Trennleistung nicht negativ beeinflusst wird.

Aufgrund des Elektrodenmaterials beträgt der Spannungsbereich für den coulometrischen Array-Detektor -1 V bis +2 V [61]. Die Arbeitsspannung an den bis zu 16 Elektroden kann mit einem Inkrement von 1 mV innerhalb dieses Potentialfensters eingestellt werden. Es können chromatographisch koeluiierende Substanzen aufgelöst werden, deren Halbstufenpotentiale um mindestens 60 mV differieren. Die ersten Applikationen fand der coulometrische Array-Detektor in der neurochemischen Analytik, bei der sehr hohe Empfindlichkeiten und eine sehr hohe Selektivität gefordert sind. Bis heute wächst die Zahl der Applikationen dieses Detektionssystems stark [65-69]. Eine Gegenüberstellung der Nachweisstärken amperometrischer und coulochemischer Array-Detektion erfolgt am Beispiel von Amitrol: 1987 konnte in Organen nach gelchromatographischer Aufreinigung der Proben mit amperometrischer Detektion an der Glaskohle-Elektrode eine Nachweisgrenze von 60 ng/g erzielt werden [70]. Für die Bestimmung von Amitrol in Oberflächenwasser betrug 1993 die Nachweisgrenze 50 pg/g ohne Probenvorbereitung [68].

Die Nachteile dieses Detektionssystems sind, neben den für einen elektrochemischen Detektor hohen Anschaffungskosten, auch die Festlegung auf Kohlenstoff als Elektrodenmaterial speziell und allgemein die Beschränkung auf Festkörperelektroden. Die Selektivität wird eingeschränkt, wenn ein Depolarisator mehrere intensive Oxidations- oder Reduktionsstufen hat.

3.2.5 Verfahren zur Entfernung von Luftsauerstoff aus dem analytischen System

Bei reduktiven Analysen zwischen 0 V und -1 V stört der aus der Umgebung gelöste Luftsauerstoff im Eluenten bzw. Grundelektrolyten. Bei ca. -200 mV (je nach Referenzsystem und pH-Wert) findet folgende Reaktion statt [71]:



Die zweite Reduktion findet bei -800 mV statt:



Die Entfernung des Sauerstoffs aus kontinuierlich fließenden Systemen ist wesentlich aufwendiger als in Batchsystemen, da der Sauerstoff durch Diffusion über die Leitungen wieder eindringen kann. Zunächst kann der Eluentenvorrat mit Helium, Argon oder Stickstoff gespült werden. Edelgase sind Stickstoff vorzuziehen, da sie eine schlechtere Löslichkeit in Flüssigkeiten aufweisen. Argon legt sich aufgrund seines hohen Atomgewichtes wie ein inerte Teppich auf die Flüssigkeitsoberfläche. Theoretisch kann der Sauerstoff annähernd vollständig aus dem Vorratsgefäß entfernt werden. Weiterhin kann der Eluent mit handelsüblichen Degassern von Sauerstoff befreit werden [72]. Hier wird ein Vakuum angelegt, so daß der Sauerstoff über eine mikroporöse Membran entweicht. Teflon ist als Leitungsmaterial im Niederdruckbereich nicht geeignet, da die Sauerstoffpermeabilität zu hoch ist. Hier können Polyvinylidendifluorid ummantelte Teflonleitungen verwendet werden (No-OxTM). Für den Hochdruckteil der HPLC bieten sich Stahl- oder Polyetheretherketon (PEEK)-Kapillaren an.

Sauerstoff kann chemisch in einer coulometrischen Durchflußzelle entfernt werden. Dabei werden die Reaktionen (Gl. 3.9 und 3.10) der Detektion vorweggenommen und es entstehen keine störenden Nebenprodukte.

Auch bei der Probeninjektion wird Sauerstoff in das System eingebracht. In manchen Fällen trennt sich der mitinjizierte Sauerstoff chromatographisch von den anderen Analyten ab. Unberücksichtigt dessen sollten auch die Proben von Sauerstoff befreit werden.

Um beim Entgasen die Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten zu bewahren und Proben nicht einzuengen, muß das verwendete Gas mit dem verwendeten Solvent gesättigt werden.

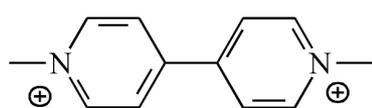
3.3 Allgemeine Eigenschaften und Chromatographie der verwendeten Verbindungen

3.3.1 Quaternäre Ammoniumverbindungen

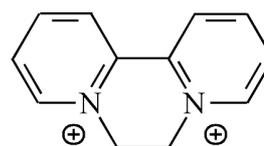
Paraquat (PQ), Diquat (DQ) und Difenzoquat (DF) sind Totalherbizide. Diese Verbindungen sind toxisch. Die letale Dosen LD_{50} für Ratten betragen 214 mg/kg (DQ), 112 mg/kg (PQ) und 470 mg/kg (DF) [73]. Im Vergleich hierzu liegt die LD_{50} von E 605 bei 4 - 14 mg/kg. Die Herbizide sind in Deutschland im Einsatz. Ethylparaquat ist strukturverwand mit Paraquat, findet aber keine Verwendung als Herbizid. Alle vier Verbindungen sind aufgrund ihrer einfachen oder zweifachen positiven Ladungen sehr polar, daraus resultiert ihre schwere Flüchtigkeit. In der Analytik sind diese Verbindungen prädestiniert für eine flüssigchromatographische Trennung. Die Strukturen gehen aus Abb. 3.10 hervor.

Tabelle 3.5: Allgemeine Daten zu den vier Analyten

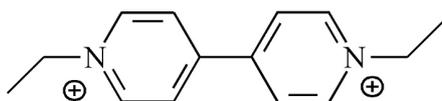
	systematischer Name	CAS-Nr.	Gegenion	M [g/mol]
DQ	1,1'-Ethylen-2,2'-bipyridinium	[85-00-7]	Br^-	362,06
PQ	1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium	[4685-14-7]	Cl^-	257,16
EQ	1,1'-Diethyl-4,4'-bipyridinium	[36305-51-8]	Br^-	374,13
DF	1,2-Dimethyl-3,5-diphenyl-1H-pyrazolium	[43222-48-6]	Methylsulfat	360,43



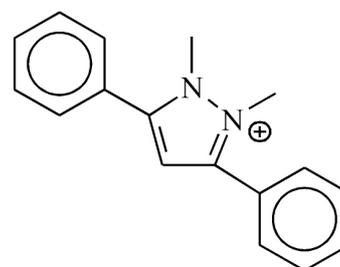
Paraquat (PQ)



Diquat (DQ)



Ethylparaquat (EQ)



Difenzoquat (DF)

Abb. 3.10: Strukturformeln der vier quaternären Ammonium-Ionen

400 Isomere vom Bipyridinium-Typ wurden in den ICI-Labors (USA) einschließlich der elektrochemischen Eigenschaften untersucht. Zwischen herbizider Wirkung und Redoxpotentialen wurden Zusammenhänge gefunden [74]. Die Verbindungen können in ihrer elektrochemisch generierten, reduzierten Form an sich elektroinaktive Substanzen reduzieren. Elektrochemische und Leitfähigkeitsdaten zeigen, daß DF in das Zentrum von Cyclodextrinen (Oligosaccharide, die beim bakteriellen Abbau von Stärke entstehen) eingebaut werden kann, was eine plausible Erklärung für die Akkumulation von DF in biologischen Systemen ist [95].

Die Methoden der flüssigchromatographischen Trennung der Herbizide sind sehr vielfältig. Es werden Trennphasen aller Polaritäten verwendet. DQ und PQ haben ein sehr ähnliches Retentionsverhalten.

Tabelle 3.6: Übersicht über HPLC-Methoden für die vier quaternären Ammoniumverbindungen

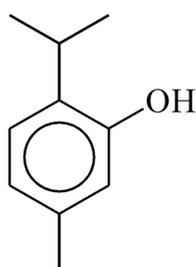
Analyten	stationäre Phase	Eluent	Matrix	Detektion	Quelle
DQ, PQ	Polystyrol-divinylbenzol	100 vol.-% H ₂ O 2 % H ₃ PO ₄ 0,7 % DEA 0,15 % HSA	Kartoffeln	UVD	[75]
DQ, PQ	RP 18	100 vol.-% H ₂ O 0,1 % HSA 0,35 % TEA pH 2,5 (H ₃ PO ₄)	H ₂ O	UVD	[76]
DQ, PQ, DF	RP 18	93 vol.-% H ₂ O 0,2 % HSA 1 % H ₃ PO ₄ pH 4,1 (TEA) 7 vol.-% Acetonitril $\xrightarrow{\text{grad}}$ 70 : 30 vol.-% H ₂ O / Acetonitril	H ₂ O	UVD	[77]
DQ	RP 18	89 vol.-% H ₂ O 0,07 % OSA 2,5 % H ₃ PO ₄ 0,8 % DEA 7 vol.-% Acetonitril 4 vol.-% Tetrahydrofuran	Leber, Niere, Urin, Blut	UVD	[78]
DQ, PQ	RP 18	75 vol.-% H ₂ O 0,2 % OSA 2 % H ₃ PO ₄ pH 3 (DEA) 25 vol.-% Methanol	Plasma, Urin, Augen	UVD	[79]
DQ, PQ	RP 18 / Kationenaustauscher	100 vol.-% H ₂ O $\xrightarrow{\text{grad}}$ 90 : 10 vol.-% H ₂ O / Methanol	H ₂ O	MSD	[80]

Analyten	stationäre Phase	Eluent	Matrix	Detektion	Quelle
DF	RP 8	70 vol.-% H ₂ O 0,2 % OSA 2 % H ₃ PO ₄ pH 3 (0,7 % DEA)	H ₂ O	UVD	[81]
		30 vol.-% Acetonitril			
DQ, PQ	RP 2	88 vol.-% H ₂ O 0,2 % OSA 0,04 % DEA pH 2,4 (H ₃ PO ₄)	Leber, Niere, Muskeln	ECD	[2]
		12 vol.-% Methanol			
DQ, PQ	-NH ₂	66 vol.-% H ₂ O 20 vol.-% Methanol 14 vol.-% Acetonitril	Früchte, Gemüse	UVD	[82]
DQ, PQ, DF	Kieselgel	90 vol.-% H ₂ O 3 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2 % TEAOH pH 3 (H ₂ SO ₄)	H ₂ O	UVD	[83, 84]
		10 vol.-% Methanol $\xrightarrow{\text{grad}}$			
		50 : 50 vol.-% H ₂ O / Methanol			

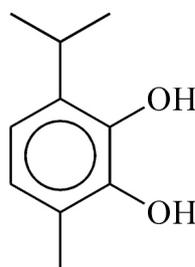
DEA = Diethylamin; HSA = Heptansulfonsäure Natriumsalz; TEA = Triethylamin; TEAOH = Tetraethylammoniumhydroxid; OSA = Octansulfonsäure Natriumsalz; ECD = elektrochemischer Detektor; UVD = Wellenlängendetektor; RP = Umkehrphase

3.3.2 Phenole und Polyphenole, Flavonoide

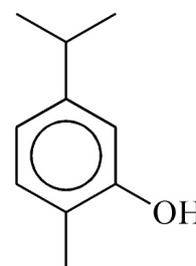
Thymol und Carvacrol sind natürliche Inhaltsstoffe des Thymians. Sie sind vertreten in ätherischen Ölen, die aus Thymian und anderen Gewürzen und Kräutern gewonnen werden. Beide Verbindungen und p-Cymen-2,3-diol (Struktur Abb. 3.11) sind antioxidativ wirksam. Thymol übertrifft Phenol (C₆H₅-OH) hinsichtlich antiseptischer Wirksamkeit [85].



Thymol



p-Cymen-2,3-diol



Carvacrol

Abb. 3.11: Strukturformeln der drei monocyclischen Phenole

Die Flavone leiten sich von dem in Abb. 3.12 gezeigten Grundgerüst ab. In Tabelle 3.7 werden die bis auf Fisetin natürlich vorkommenden Isomere mit freien OH-Gruppen aufgezählt. Auch das als Komplektierungsreagens verwendete Morin gehört als 2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavon in diese Verbindungsklasse. Die OH-Gruppen an den Positionen 3, 4' und 7 können durch Methoxygruppen oder Glucoside ersetzt werden. So kommt Quercetin meistens in seiner glucosidischen Form vor. Die Flavonoide sind in der Pflanzenwelt weit verbreitete gelbe Farbstoffe, die in Blättern, Blüten und Pollen vorkommen. Von großem Interesse ist die antioxidative Wirksamkeit von Quercetin [86, 87]. Es kann vermutet werden, daß die Oxidation des Quercetins enzymkatalysiert wird [88]. Aufgrund der großen Anzahl der kommerziell erhältlichen isomeren Flavonoide kann die Strukturabhängigkeit der antioxidativen Wirksamkeit gut untersucht werden.

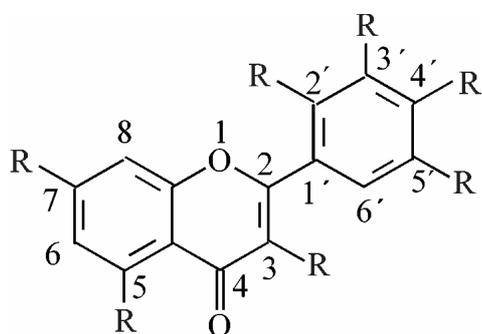


Abb. 3.12: Grundgerüst der Flavonoide

Tabelle 3.7: Isomere Flavonoide

	R ₃ =	R ₅ =	R ₇ =	R _{2'} =	R _{3'} =	R _{4'} =	R _{5'} =
Apigenin	H	OH	OH	H	H	OH	H
Fisetin	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Galangin	OH	OH	OH	H	H	H	H
Kämpferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Luteolin	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Morin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H

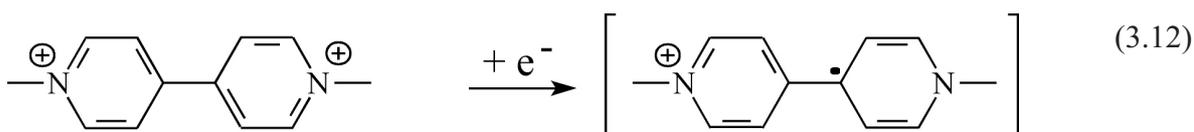
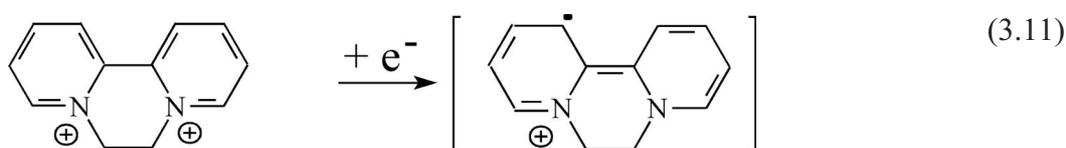
Die flüssigchromatographische Trennung von Carvacrol, p-Cymen-2,3-diol und Thymol wird von Ternes, Schwarz und weiteren Mitarbeitern beschrieben [14, 89]. Innerhalb von 20 Minuten lassen sich die drei Analyten mit einer C 18-Phase isokratisch mit einem Eluenten aus 50 vol.-% Acetonitril und 50 vol.-% einer wässrigen Lösung von Citronensäure und TEAOH trennen. Es wird amperometrisch bei 800 mV detektiert.

Die Flavonoide lassen sich mit einem Gemisch aus 2 %iger wässriger Essigsäure und Acetonitril an einer RP 18 Phase auf Polymer- oder Kieselgel-Basis trennen [90]. Variierend mit der Vielzahl der enthaltenen Flavonoide wird ein Gradient mit steigendem Acetonitrilgehalt angewendet.

3.4 Elektrochemie der verwendeten Verbindungen

3.4.1 Quaternäre Ammoniumverbindungen

DQ, PQ, EQ und DF sind elektrochemisch reduzierbar. Die drei Viologene Paraquat, Diquat und Ethylparaquat reagieren analog [74, 91, 92]. Das elektrochemische Verhalten wird exemplarisch anhand eines Cyclovoltammogrammes von Paraquat [93] erläutert (Abb. 3.13). Durch den Transfer eines Elektrons auf das Dikation wird der erste kathodische Peak verursacht, wobei ein Radikal generiert wird, Gl. (3.12). Dieses wird durch die Übertragung eines zweiten



Elektrons weiterreduziert, Gl. (3.13), wodurch ein zweiter kathodischer Peak im Voltammogramm erscheint:



Die erste Elektronenübertragung ist reversibel, die Reversibilität der zweiten Elektronenübertragung wird durch eine Folgereaktion eingeschränkt: PQ^0 und PQ^{2+} können zu PQ^{1+} komproportionieren. Diquat reagiert analog zu Paraquat (Gl. 3.11 und 3.14). Die Verbindungen vom Dipyridinium-Typ weisen für Systeme maximaler Reversibilität die niedrigsten Halbstufenpotentiale auf. Die Halbstufenpotentiale für die in dieser Arbeit verwendeten Viologene werden in Tabelle 3.8 gegeben:

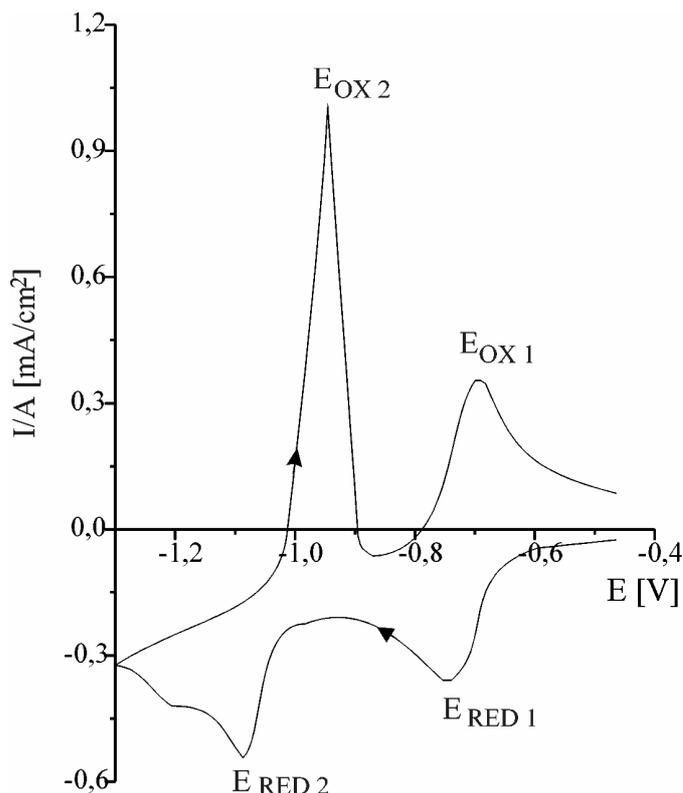


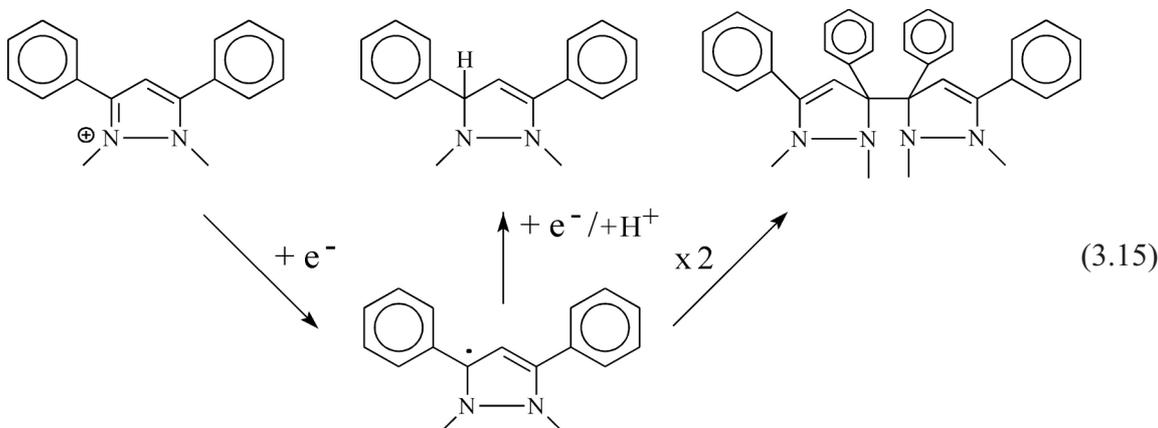
Abb. 3.13: Cyclovoltammetrie von Paraquat an einer MFE ($c = 360 \mu\text{g/mL}$), in $0,1 \text{ mol/L}$ wässriger NaF Lösung, $v = 100 \text{ mV/s}$ [92]

Tabelle 3.8: Halbstufenpotentiale $E_{1/2}^{(1)}$ und $E_{1/2}^{(2)}$ der quaternären Ammoniumverbindungen in wässrigen Medien

	$E_{1/2}^{(1)}$ [V]	$E_{1/2}^{(2)}$ [V]	pH	Referenzelektrode	Quelle
Diquat	-0,69	-1,00	5,0	gesättigte Kalomelektrode	[91]
Paraquat	-0,66	-0,98		gesättigte Kalomelektrode	[74]
Ethylparaquat	-0,45	-		Normalwasserstoffelektrode	[74]
Difenzoquat	-1,52	-	7,0	Ag/AgCl, 1 mol/L LiCl	[94]

Für DF werden die Halbstufenpotentiale mit $-1,37 \text{ V}$ in Methanol und $-1,27 \text{ V}$ in Acetonitril vs. Ag/AgCl (1 mol/L LiCl) angegeben [94]. Die Abhängigkeit des Halbstufenpotentials vom Grundelektrolyten ist durch die stöchiometrische Beteiligung von Protonen an der Reaktion zu erklären. Bei der Elektrodenreaktion wird ein Elektron auf den Pyrazolring übertragen. Für das entstandene Kohlenstoffradikal bestehen zwei Reaktionsmöglichkeiten:

Dimerisierung mit einem zweiten Kohlenstoffradikal - Gl. (3.15) - oder Aufnahme eines weiteren Elektrons [49]. Das Anion nimmt dann ein Proton auf, es entsteht ein 3-Pyrazolin.



Der Elektronentransfer ist schnell und der gesamte Prozeß involviert zwei Elektronen. Die Irreversibilität wird durch die anschließende chemische Reaktion bewirkt. Difenzoquat wird stark an Quecksilberoberflächen adsorbiert, auch bei Konzentrationen im Spurenbereich [94-96].

Alle vier Analyten zeigen starke Adsorptionseigenschaften aufgrund des lipophilen Charakters des mehrere Kerne enthaltenden π -Systems [74, 91-96].

Die Redoxreaktivität der hier behandelten Verbindungen wird bereits elektrochemisch analytisch im Spurenbereich genutzt:

Polák und Volke verwenden Puls-Polarographie und erreichen eine Nachweisgrenze von 40 $\mu\text{g/mL}$ [92]. Walcarius und Lamberts entwickelten eine SquareWave-voltammetrische Bestimmungsmethode für Paraquat und Diquat in Oberflächenwässern mit den Nachweisgrenzen 40 ng (entsprechend 4 ng/mL) für PQ und 50 ng (entsprechend 5 ng/mL) für DQ [97]. Zen und Mitarbeiter präsentieren eine Methode für PQ im Batch mit kathodischer Stripping Voltammetrie an einer persulfonierten Ionomer / silikatmodifizierten Elektrode [98]. Hier wird eine Nachweisgrenze von 0,5 ng/mL angegeben. Auch wird sehr ausführlich über mögliche Interferenzen mit anderen Matrixbestandteilen in Oberflächenwässern, wie z. B. Metallkationen und oberflächenaktive Substanzen eingegangen.

In einer aktuellen Publikation werden zwei Vorgehensweisen für die elektrochemische Analytik von DQ und PQ vorgeschlagen: Zum einen werden die Analyten ($V = 65 \mu\text{L}$) mit Fließinjektionsanalyse an einer mit oberflächenaktiven Substanzen vorbehandelten Carbonpaste Elektrode amperometrisch detektiert (Nachweisgrenzen: 4,8 ng/mL für DQ und 6,3 ng/mL für PQ) [99]. Weiterhin wurde die Methode durch eine Anreicherung der quaternären Ammoniumionen am Ionenaustauscher erweitert. Die Nachweisgrenzen konnten dadurch

verbessert werden. Sie betragen 20 pg/mL für DQ und 16 pg/mL für Paraquat. Ein hydrodynamisches Voltammogramm, das unter Variation der Detektorspannung und acht Injektionen von DQ an der Carbonpaste Elektrode aufgenommen wurde, zeigt ein Peakmaximum bei - 800 mV vs. Ag/AgCl (3 mol/L KCl).

Mit einer Paraquat-sensitiven Elektrode werden Nachweisgrenzen um 150 pg/mL mit Fließinjektionsanalyse erzielt. Diese potentiostatische Meßmethode wird für die Bestimmung von PQ in Herbizidpräparaten und biologischen Proben angewendet [100, 101].

Alle elektrochemisch analytischen Methoden, die im Batch oder mit Fließinjektionsanalyse ausgeführt werden, haben den Nachteil, daß entweder nur Paraquat oder nur Diquat bestimmt werden können. Beide Herbizide interferieren aufgrund ihres sich nur um 30 mV unterscheidenden Halbstufenpotentials, so daß sie nicht einzeln quantifizierbar sind.

3.4.2 Phenole und Polyphenole

Thymol, Carvacrol und p-Cymen-2,3-diol

Diese drei Verbindungen sind elektrochemisch oxidierbar, jedoch gibt es noch keine ausführlichen elektrochemischen Studien die Elektrolyse, Cyclovoltammetrie und Chronoamperometrie beinhalten. Demzufolge liegen auch keine Informationen über den elektrochemischen Reaktionsmechanismus dieser Phenole vor.

Die Halbstufenpotentiale wurden von Ternes et al. mit HPLC-ECD an der Glaskohle Elektrode durch Mehrfachinjektion und Variation der Detektorspannung bestimmt [14]. Die Halbstufenpotentiale betragen 0,64 V für p-Cymene-2,3-diol, 0,79 V für Thymol und 0,85 V für Carvacrol, vs. Ag/AgCl in 3 mol/L KCl.

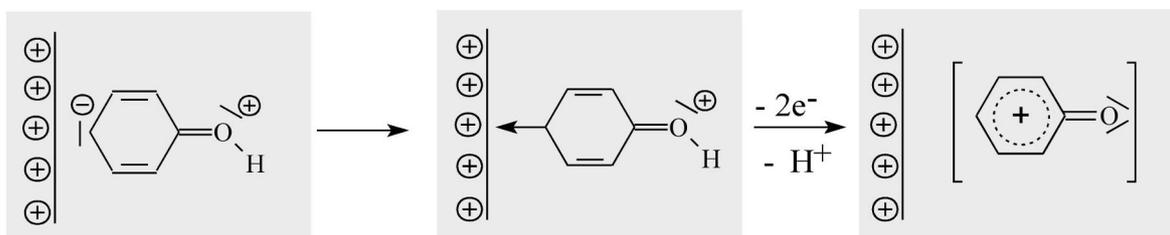


Abb. 3.14: Elektrochemische Oxidation des Phenols im sauren Medium

Die Betrachtung elektrochemischer Mechanismen strukturell einfacherer Phenole kann hier dienlich sein [102]. Der Reaktionspfad ist vom pH-Wert abhängig. Bei niedrigen pH-Werten, wenn das Phenol protoniert vorliegt, werden dem Phenolring para-ständig zur OH-Gruppe zwei Elektronen entzogen, Abb.3.14. Das Phenol spaltet dann ein Proton ab und liegt als

Oxoniumion vor. Dieses kann chemische Folgereaktionen eingehen, die vom Solvent abhängen: In Methanol ist eine Methoxylierung in orto- oder para-Stellung möglich, in wäßrigen Lösungen kann eine OH-Gruppe addiert werden. In Lösungen mit höheren pH-Werten liegt das Phenol anionisch vor. Es wird über eine Oxo-Brücke an der Anode gebunden (Abb. 3.15). Durch Abgabe eines Elektrons entsteht ein neutrales Radikal. Dieses kann mit dem Solvent Reaktionen eingehen oder dimerisieren. Es wird hierbei deutlich, daß eine Vielzahl Reaktionen ablaufen können, die stark Solvent-abhängig sind. Die elektrochemische Oxidierbarkeit des Thymols wird für dessen Einsatz in Pharmazeutika analytisch genutzt [103].

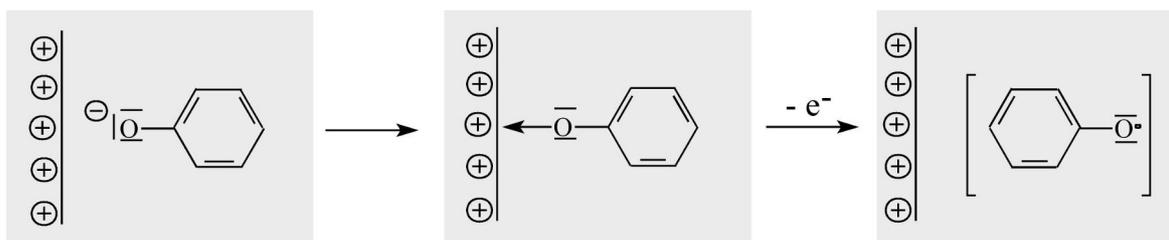


Abb. 3.15: Elektrochemische Oxidation des Phenols im alkalischen Medium

Flavonoide

Die elektrochemische Oxidation von Flavonoiden ist äußerst komplex [104-107]. Quercetin zeigt drei Oxidationsstufen bei 83 mV, 440 mV und 840 mV. Beim reduktiven Scan zeigt sich eine kleine Stufe bei 83 mV. Das Verhältnis von kathodischem zu anodischem Peakstrom in Abhängigkeit von der Spannungsvorschubgeschwindigkeit zeigt bei ca. 100 mV/s eine geringe Reversibilität und bei etwa 1 V/s eine zunehmende Reversibilität. Die Reversibilität der Gesamtreaktion erhöht sich, weil sich der Elektronenübertragung offensichtlich eine chemische Reaktion anschließt, die relativ langsam abläuft, bezüglich der Zeitskala des Experimentes bei hoher Spannungsvorschubgeschwindigkeit. Die Zuordnung der Oxidationsstufen zu den oxidierbaren funktionellen Gruppen im Molekül erfolgt über die Messung strukturisomerer Flavonoide. Bei Luteolin fehlt die OH-Gruppe an C-3, im Cyclovoltammogramm fehlt das oxidative Signal bei 440 mV. Daraus wird geschlossen, daß diese OH-Gruppe unmittelbar an der Redoxreaktion bei diesem Potential beteiligt ist. Galangin als isomeres Flavonoid hat keine phenylischen OH-Gruppen an C-3' und C-4' und das oxidative Signal bei 83 mV fehlt. Somit sind diese beiden Gruppen in den Redoxprozeß bei dem niedrigstem Potential involviert. Die potentialkontrollierte Elektrolyse von Quercetin, die diese erste Umsetzung erfasst, ergibt einen Elektronenumsatz von $2,2 \pm 0,1$ pro Molekül. Das Redoxpotential der ersten Stufe ist stark pH-abhängig. Jørgensen und Mitarbeitern [107] gelang es, das Elektrolyseprodukt zu isolieren und interpretieren NMR- und massenspektroskopische Ergebnisse mit der Struktur XI, Abb. 3.16. Die Strukturen IX und XI sind jedoch nicht mit

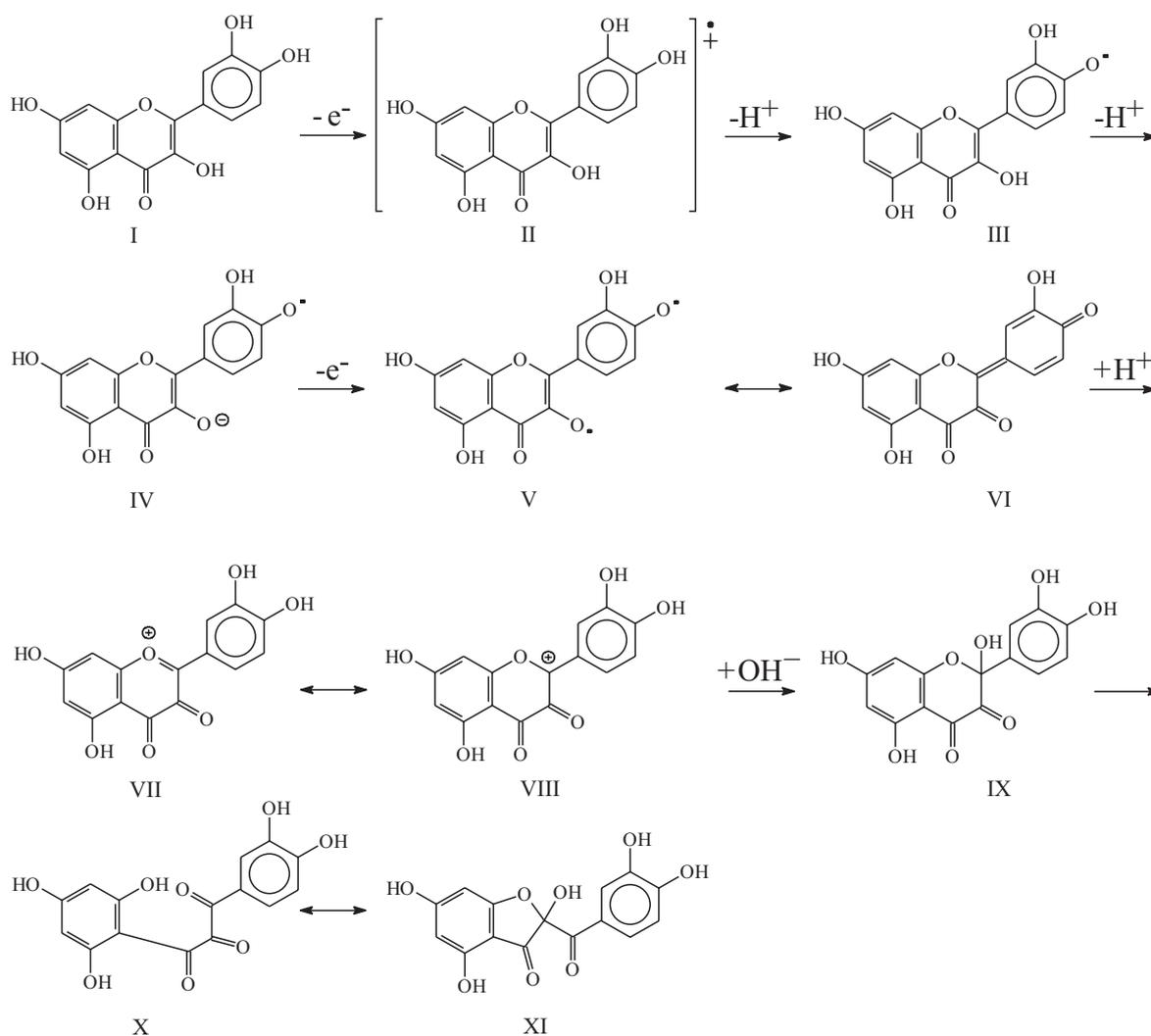


Abb. 3.16: Mechanismus der elektrochemischen Oxidation von Quercetin im wässrigen Medium [107]. I = Quercetin, IX = 2,3',4',5,7-Pentahydroxiflavan-3,4-dion, XI = 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxi-3(2H)-benzofuranon

den hier aufgenommenen ^{13}C -, ^1H - und zweidimensionale ^1H - ^{13}C -korrelierten NMR-Spektren zu unterscheiden. Das Triketon, welches aus der Öffnung des Halbacetals IX entstehen soll, kann bisher nicht nachgewiesen werden, so daß ein Beweis, welche der beiden Strukturen das tatsächliche elektrochemische Oxidationsprodukt ist, noch zu erbringen ist. Für den hier angegebenen Reaktionspfad ist die OH-Gruppe an Position C-3 notwendig. Cyclovoltammetrische Messungen zeigen jedoch eine Redoxreaktivität bei 225 mV [105]. So muß für die Oxidation des Phenylrings im Luteolin ein vom Quercetin abweichender Reaktionsmechanismus ablaufen.

Zusammenfassend läßt sich die elektrochemische Oxidierbarkeit der Flavonoide auf drei Zentren im Molekül lokalisieren: OH-Gruppen am Phenylring, eine OH-Gruppe an C-3, ein oder zwei OH-Gruppen an den Positionen C-5 und C-7. Der Mechanismus der Oxidation ist nur für das erstgenannte Reaktionszentrum bekannt und hier wiederum nur für den Fall des Quercetins.

Jungbluth zeigt mit seiner Arbeit auf, daß durch chemische Oxidation mit Cu^{2+} Ionen die selben Oxidationsprodukte des Quercetins und Kaempferol entstehen, wie durch elektrochemische Oxidation dieser Edukte [90].

Kenntnisse über die Reduzierbarkeit der Flavonoide gehen aus sehr viel früheren Untersuchungen hervor [108]. Die Halbstufenpotentiale werden mit -1,46 V für Quercitrin (3-Rhamnopyranosid des Quercetins), -1,53 V für Quercetin, -1,57 V für Apigenin und -1,25 V für Flavonol vs. gesättigte Kalomelelektrode und bei pH 5,6 angegeben. Die Carbonylfunktion in Position C-4 wird durch Übertragung eines Elektrons und anschließender Protonierung reduziert. Das entstandene Radikal disproportioniert, so daß an C-4 eine Alkoholfunktion entsteht. Das Reaktionsprodukt zeigt eine auffällige strukturelle Verwandtschaft zu den Anthocyanidinen, dem farbgebenden Bestandteil in Anthocyanen. Dieser Gruppe von Pflanzenfarbstoffen gehören fast alle roten, violetten und blauen Blüten und Beerenfarbstoffe an [85].

Die elektrochemische Reaktivität der Flavonole wird nur vereinzelt spurenanalytisch angewendet [109, 110]. Aluminium, Eisen und Indium werden indirekt über die Komplexbildung mit Morin an einer statischen Quecksilbertropfelektrode bestimmt [111, 112].

4 Experimenteller Teil

4.1 Hydrodynamisch voltammetrische Detektion in der HPLC (HPLC-HDVD)

4.1.1 Methodologie

Im experimentellen Teil dieser Arbeit treten unterschiedliche Gerätekonfigurationen auf. Es werden im Text nur Hinweise auf versuchsentscheidende Apparate und Einstellungen gegeben. Die genauen Beschreibungen finden sich im Anhang wieder.

Die Reagentien, die im experimentellen Teil verwendet wurden, waren, wenn nicht anders angegeben vom Reinheitsgrad für Analyse. Das Wasser wurde mit einer Millipore[®]-Anlage aufgereinigt, so daß der Widerstand größer als 8 M Ω war. Diquat stammte von der Firma Dr. Ehrenstorfer (Augsburg), Paraquat und Difenzoquat stammten von Riedel de-Haën (Seelze) und Ethylparaquat von Aldrich (Milwaukee, USA). Das Quecksilber war von 99,9995 %iger Reinheit (Degussa, Hanau).

Für die quaternären Ammonium-Verbindungen, bzw. Herbizide mußte zunächst eine HPLC-Trennmethode gefunden werden. Ein isokratischer Eluent und kurze Retentionszeiten, sowie eine Basislinientrennung werden gefordert. Für die Entwicklung wird ein Wellenlängendetektor (UVD) eingesetzt. Für die spätere Applikation des HPLC-HDVD Systems sollen Oberflächenwasserproben dotiert und mit Festphasenextraktion angereichert werden. Der Anreicherungsfaktor, der erzielt werden soll, hängt von der Nachweisstärke der scannenden voltammetrischen Detektion ab. Die Festphasenextraktion (SPE) wird mit HPLC-UVD evaluiert, so daß die Analysenergebnisse verschiedener Detektionsmethoden miteinander verglichen werden können.

Verschiedene Spannungsmodulationen werden im Batch angewendet, um in kurzen, leicht durchführbaren Versuchen abzuschätzen zu können, wie sich die Analyten elektrochemisch im Fluß verhalten. Um ähnliche Bedingungen wie in der hydrodynamischen Voltammetrie zu schaffen, wird hier als hydrodynamische Methode im Batch die Polarographie mit der SMDE angewendet. Die Parameter für voltammetrische, bzw. polarographische Messungen werden optimiert. Der Einfluss des Eluenten, der gleichzeitig als Grundelektrolyt für die voltammetrische Detektion fungiert, wird im Batch untersucht. Hierbei wird der Zusammenhang zwischen verwendetem Leitsalz, pH-Wert und Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen zum Grundelektrolyten und Signal- Rauschverhältnis im Batch geprüft. Nach

Walcarius und Lamberts wird eine Verbesserung des Signal- zu Rausch - Verhältnisses durch den Zusatz von Gelatine zum Grundelektrolyten erwartet [97].

Die voltammetrische Detektionsmethode für DQ, PQ, EQ und DF soll unter Verwendung der HMDE entwickelt werden, da alle vier Analyten innerhalb des Arbeitsbereiches von -2 V bis 0,2 V (Tabelle 3.3, S. 9) von reinem Quecksilber detektierbar sind. Die Quecksilberfilmelektrode wird als alternatives Elektrodenmaterial für DQ, PQ und EQ in Betracht gezogen. Nach den Literaturangaben (Tabelle 3.3, S. 9) wird durch die Abscheidung eines Quecksilberfilms auf der Glaskohle-Oberfläche der Detektionsbereich um -200 mV ausgedehnt. Es ist zu erwarten, daß der Grundstrom einer MFE gegenüber einer unbehandelten GC-Elektrode erheblich gesenkt wird. Für die Verwendung des hängenden Quecksilbertropfens und des Quecksilberfilms als Elektroden müssen optimale instrumentelle Voraussetzungen geschaffen werden. Dieses sind vor allem die Zellarchitektur und die daraus resultierenden Strömungsverhältnisse. Ein Kriterium zur Optimierung soll die Lebensdauer der HMDE und der MFE sein. Beeinträchtigungen durch in Proben und im Eluenten gelösten Luftsauerstoff müssen ausgeschlossen werden. Die Steuereinheit für die voltammetrische Detektion in Kopplung mit der HPLC, bestehend aus einem Potentiostaten, dem PC und der Steuerungssoftware muß den Anforderungen der Durchflussanalytik entsprechen. Zwei instrumentelle Konfigurationen sind verfügbar, um ihre Eignung zur Verwendung in der online scannenden Voltammetrie zu testen. Es werden Prozeduren ausgearbeitet, mit deren Hilfe große Datenmengen handhabbar sind und die zur Quantifizierung notwendigen Werte aus den Messdaten entnommen werden können.

Nachdem die instrumentellen Voraussetzungen geschaffen worden sind, sollen die mit SPE angereicherten Wasserproben mit HPLC-HDVD analysiert werden. Hierbei kommen die HMDE und der MFE als Elektroden zum Einsatz und es werden Differenzpuls-, Multipuls- und amperometrische Voltammetrie als elektrochemisch analytische Methoden online angewendet.

In einem kurzen Beispiel wird die Detektion mit hydrodynamischer Voltammetrie auf die drei Phenole Thymol, Carvacrol und p-Cymen-2,3-diol angewendet, wobei hier eine Glaskohle Elektrode zum Einsatz kommt.

4.1.2 Chromatographie und Probenaufarbeitung für die Herbizide

Chromatographie

Zur Trennung wurden Säulenmaterialien hoher und niedriger Polarität erprobt. Folgende Säulen mit RP 18 Trennphase wurden getestet: Merck Lichrocart, Macherey + Nagel

Nucleosil, Knauer Eurospher und Merck Purospher endcapped, alle mit den Dimensionen 250 mm x 4 mm. Die Zusammensetzung der Elutionsmittel erfolgte nach den Quellen [76, 77 und 79] (siehe auch Tabelle 3.6). Dabei konnten DQ und PQ mit den erstgenannten Säulen nicht basisliniengetrennt werden. Nur mit der desaktivierten RP 18 gelang dies zufriedenstellend. Das Elutionsmittel bestand aus wässriger Phase mit 10 mmol/L Heptansulfonsäure Natriumsalz, 100 mM H₃PO₄ und 10 mmol/L Tetraethylammoniumhydroxid bei pH 4,1. Der Gradient zu einem Acetonitril-Anteil von 50 vol.-% für die Abtrennung des DF konnte nicht luftblasenfrei angewendet werden.

Es wurde eine Niederdruckgradienten-fähige HPLC-Pumpe eingesetzt (Maxi-Star K-100, Knauer, Berlin). Die Trennung der vier Analyten wurde mit einer Kieselgelsäule in Anlehnung an [83, 84] unter folgenden Bedingungen realisiert:

<i>Vorsäule:</i>	5 mm x 4 mm ID, 3 µm Spherimage Kieselgel	<i>Analytische Säule:</i>	50 mm x 4,6 mm ID 3 µm Spherimage Kieselgel
<i>Eluent:</i>	90 vol.-% H ₂ O 3 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2 % TEAOH pH 3 (H ₂ SO ₄) 10 vol.-% Methanol	<i>Probenschleife:</i>	20 µL
<i>Fluß:</i>	0,7 mL/min	<i>Solvent für Standards:</i>	Methanol / Wasser 1:1
<i>Detektor:</i>	Knauer Variable Wavelength Monitor, DQ 310 nm; PQ, EQ und DF 260 nm		
		<i>Entgasen des Eluenten:</i>	Spülen mit Ar

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Trennung der vier quaternären Ammoniumverbindungen in den folgenden Abschnitten wie oben angegeben durchgeführt. Die Nachweisgrenzen (NWG) wurden mit der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 [113] wie folgt bestimmt:

Tabelle 4.1: Nachweisgrenzen für die Bestimmung von DQ, PQ, EQ und DF mit HPLC-UVD, n = 28

	DQ	PQ	EQ	DF
NWG [ng/mL]	110	120	110	310
NWG absolut [ng]	2,2	2,4	2,2	6,2

Dabei erfolgte die Ermittlung des Responses über die Integration der Peakflächen. Die Kalibriergeraden sind nach Doerffel [114] in den Konzentrationsbereichen 0,3 bis 40 µg/mL (DQ, PQ und EQ), bzw. 0,6 bis 40 µg/mL (DF) linear. Aus Abbildung 4.1 wird ersichtlich, daß die vier Peaks basisliniengetrennt sind. Im Chromatogramm ist die vom UV-Detektor ausgegebene und zur Absorption proportionale Spannung zu erkennen. Der

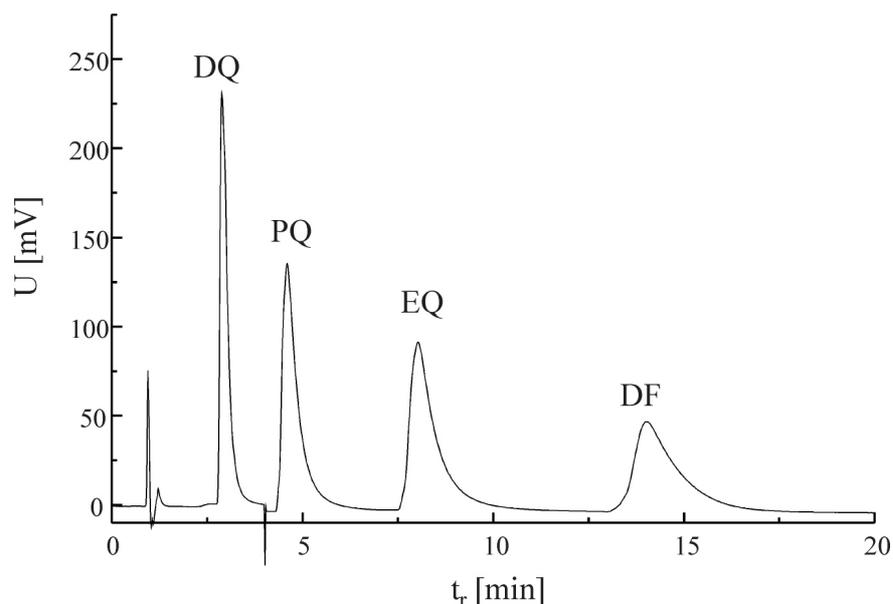


Abb. 4.1: Chromatogramm mit HPLC-UVD der vier quaternären Ammoniumverbindungen mit einer Konzentration von je 40 $\mu\text{g/mL}$

Basislinieneinbruch bei ca. 4 min wurde durch Umschalten der Wellenlänge verursacht. Die Leistungsfähigkeit der Kieselgeltrennphase ist zeitlich begrenzt und bricht nach ca. 200 Injektionen deutlich ein [83, 84], eine Beobachtung, die sich bestätigte.

Festphasenextraktion

Die von Ibañez, Picó und Mañes [83, 84] entwickelte Festphasenextraktion zur Anreicherung von DQ, PQ und DF wurde wie folgt modifiziert: Einmalkartuschen mit 500 mg Kieselgel (Merck, Darmstadt) wurden nacheinander mit 15 mL H_2SO_4 (0,5 mol/L), NH_3 -Lösung (0,5 %) und Wasser konditioniert. 1 L Wasserprobe, die von Oberflächengewässern aus Hannover stammten (Maschsee und Mittellandkanal) wurden mit 10 bis 25 ng DQ, PQ, EQ und DF dotiert und über einen 0,45 μm Membranfilter (Cellulose) filtriert. Die Proben liefen innerhalb von 2 h durch die Festphasenkartuschen. Die Verbindungen wurden mit 35 mL einer Mischung aus 50 % Methanol und 50 % einer wässrigen Lösung von 3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0,2 % Tetraethylammoniumhydroxid, welche mit H_2SO_4 (2 mol/L) auf pH 3 eingestellt wurde, eluiert. Das Eluat wurde mit dem Rotationsverdampfer auf ca. 2,5 mL eingengt.

Abbildung 4.2 zeigt ein Elutionsprofil der Analyten, das bei der Festphasenextraktion nach obiger Vorschrift und fraktionierter Elution aufgenommen wurde. DF eluiert sofort von der Festphase und getrennt von DQ, PQ und EQ. Eine weitere Erhöhung der Festphasenmenge auf 750 und 1000 mg, mit dem Ziel, den Durchbruch von DF zu verhindern, führt zu einer Verschlechterung der Wiederfindungsraten von DQ, PQ und EQ. Ebenso konnte ein Zusatz

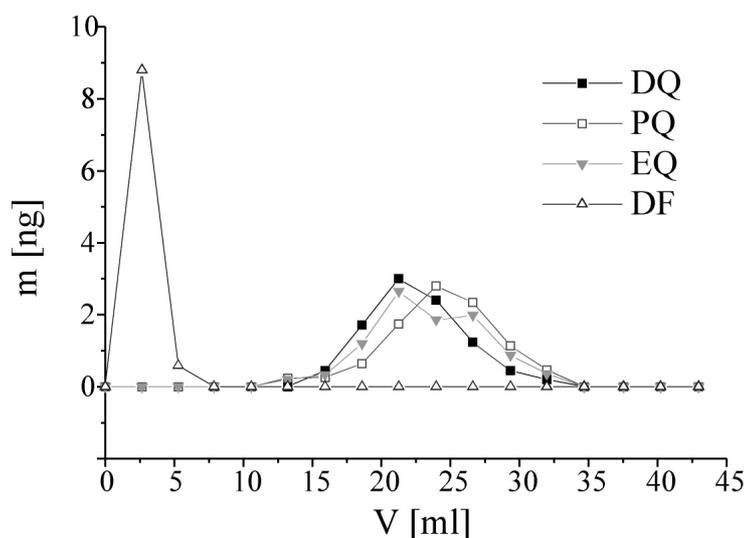


Abb. 4.2: Elutionsprofil der vier quaternären Ammoniumverbindungen von 500 mg Kieselgel-Festphase, dotiert wurden 25 ng je Analyt

von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Tetraethylammoniumhydroxid zur Wasserprobe den Durchbruch von DF nicht verhindern.

Die Analyse mit HPLC-UVD nach der Probenaufarbeitung von 12 dotierten Wasserproben in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 25 $\mu\text{g/mL}$ für jedes Herbizid ergab folgende Wiederfindungsraten und Standardabweichungen: 42 % (± 5 %) für DQ, 83 % (± 3 %) für PQ, 103 % (± 2 %) für EQ und 82 % (± 13 %) für DF.

4.1.3 Elektrochemische Vorversuche mit den Herbiziden im Batch

Instrumentelles

Für die Batch-Versuche standen folgende Meßinstrumente zur Verfügung: Ein VA-Stand 663, ausgestattet mit einer Batch-Meßzelle ($V = 15 \text{ mL}$) und Quecksilbermultimode-Elektrode, ein Platinstift als Gegenelektrode und eine Ag/AgCl Referenzelektrode mit 3 mol/L KCl als Zwischenelektrolyt. Zur Steuerung und Datenaufnahme wurde ein Polarecord 626 mit x,t -Schreiber eingesetzt (Meßanordnung I). Mit diesem Gerät können die DC-Voltammetrie, Tast-Technik und Differenzpulstechnik mit 10 und 50 mV Pulshöhen angewendet werden. Die Signale in der Meßanordnung I wurden mit einer 12 bit analog/digital-Wandlerkarte NextView (BNC, Puchheim) mit 100 kHz maximaler Datenaufnahmefrequenz und DMA-Zugriff digitalisiert, so daß eine weitere Auswertung der Daten am PC erfolgen konnte.

Die Meßanordnung II bestand aus einem VA-Stand 694 und dem Steuerungsgerät VA-Prozessor 693. Diese Konfiguration ist zwei Generationen jünger als die Meßanordnung I. Das Batchvolumen beträgt hier 10 mL, die Datenaufnahme ist digital und die bereits digitalisierten Meßdaten können über ein Modemkabel an den PC gesendet werden. Der VA-Prozessor

bietet die Möglichkeit, Methoden zu programmieren und zu speichern, sowie Peakintegration, -erkennung und Kalibration durchzuführen und auch Speicherrecourcen für Meßdateien zu nutzen. Die Elektrodenausstattungen beider VA-Stände sind identisch, mit dem VA-Prozessor 693 können die Elektroden jedoch komfortabel angesteuert und getestet werden. Der VA-Prozessor ermöglicht DC-Voltammetrie, differentielle Pulstechnik mit frei wählbaren Pulshöhen und zusätzlich Rechteck Voltammetrie.

Alle Geräte zur elektrochemischen Analytik stammten von Metrohm (Herisau, Schweiz).

Die Proben wurden jeweils für 5 min vor der Messung mit Stickstoff entgast.

Die Auswertung der Voltammogramme wurde über die Peakhöhen vorgenommen, da in der on-line scannenden Voltammetrie als Detektionsmethode für die HPLC ebenfalls die Peakhöhe entscheidend ist.

Differenzpulspolarographie (DPP) und Rechteck Polarographie (SQWP)

Zur Parameteroptimierung wurden die voltammetrischen Messungen im Eluenten der HPLC durchgeführt. Als gemeinsamer Parameter für SQWP und DPP wurde die optimale Pulshöhe bei kleinstem Signal-Rauschverhältnis ermittelt. Diese lag für SQWP und DPP für alle geprüften Analyten bei 30 mV. Die Nachweisgrenzen für DQ, PQ und DF wurden an der SMDE mit folgenden Versuchsanordnungen und Parametern bestimmt:

Tabelle 4.2: Versuchparameter für voltammetrische Messung der quaternären Ammoniumverbindungen im Batch und Anzahl der Wiederholungsmessungen (n)

Versuch Nr.	1	2	3	4	5
Messanordnung	I	II		II	
Technik	DPP	SQWP		DPP	
U_{puls} [mV]	10	30	30	30	30
U_{step} [mV]	-	2	2	2	2
Scan-Richtung	vorwärts	vorwärts	rückwärts	vorwärts	rückwärts
dU/dt [mV/s]	10	4,0	4,0	4,4	4,4
t_{mess} [ms]	-	2,0	2,0	10	10
t_{step} [s]	-	0,5	0,5	0,45	0,45
t_{puls} [ms]	-	-	-	30	30
t_{drop} [ms]	500	320	320	320	320
f [Hz]	-	100	100	-	-
n	16	16	16	16	16

Die Parameter wurden in Anlehnung an die polarographische Bestimmung von DQ und PQ von Walcarius und Lamberts [97] gewählt, um vergleichbare Bedingungen herzustellen. Die Kalibrationen wurden mit Standardaddition in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 4 $\mu\text{g/mL}$ mit 8 Aufstockungen und je zwei Parallelbestimmungen durchgeführt.

Die Kalibrationsgeraden erwiesen sich für alle Methoden und Analyten in dem geprüften Konzentrationsbereich als linear. Abbildung 4.3 zeigt Rechteck- und Differenzpuls-Polarogramme, die Nachweisgrenzen werden in Abbildung 4.4 dargestellt. Die relativen Standardabweichungen ($n = 3$) für die Wiederholungsmessung der Analyten mit $c = 2 \mu\text{g/mL}$ mit den Methoden 1 - 4 lagen zwischen 0,1 % und 4,6 %.

Für den Versuch Nr. 1 (Tab. 4.2) ergaben sich folgende Nachweisgrenzen: 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (DQ) und 1,6 $\mu\text{g/mL}$ (PQ). Ein Vergleich der Meßanordnungen I und II ergibt, daß die

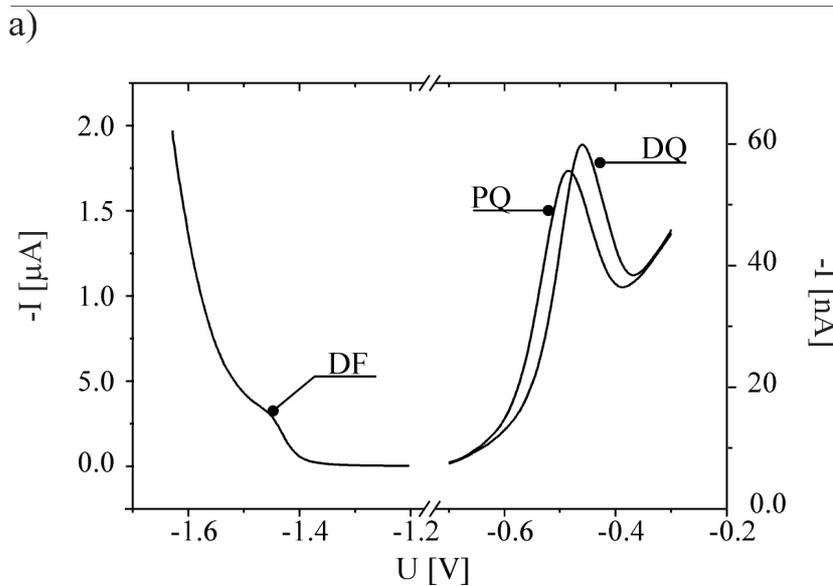


Abb. 4.3.a: SQW-Polarographie der drei Herbizide im Batch, $c = 1 \mu\text{g/mL}$, Bedingungen entsprechend Versuch Nr. 2, Tab. 4.2

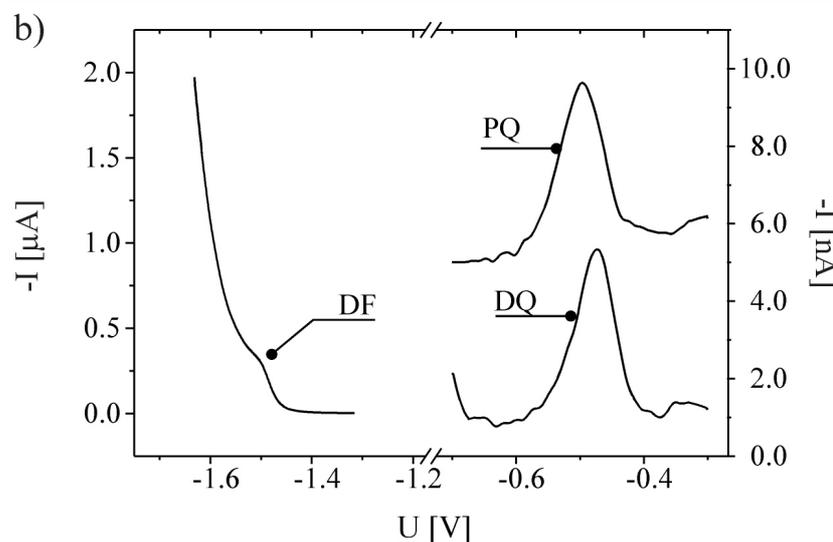


Abb. 4.3.b: DP-Polarographie der drei Herbizide im Batch, $c = 1 \mu\text{g/mL}$, Bedingungen entsprechend Versuch Nr. 4, Tab. 4.2

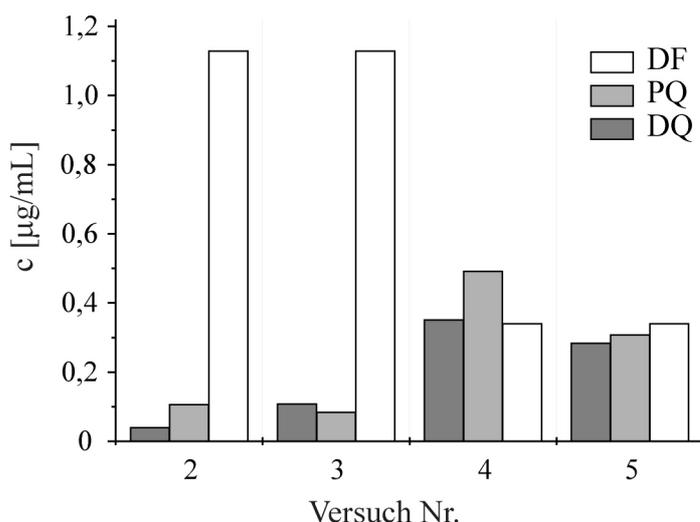


Abb. 4.4: Nachweisgrenzen der drei Herbizide mit SQWP (Versuche Nr. 2, Vorwärtsscan und 3, Rückwärtsscan), sowie mit DPP (Versuche Nr. 4, Vorwärtsscan und 5, Rückwärtsscan), $n = 16$

Nachweisstärke mit der neuen Gerätegeneration 3 bis 10-fach für diese beiden Analyten erhöht werden konnte.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus Meßanordnung II (Abb. 4.4) zeigt, daß sich mit Rechteck Polarographie um einen Faktor drei gegenüber der Differenzpuls Polarographie erniedrigte Nachweisgrenzen für PQ und DQ erzielen ließen. Ein Unterschied zwischen Vorwärts- und Rückwärtsscan, wie von Walcarius und Lamberts beobachtet [97], konnte nicht festgestellt werden. Für DF erwies sich die Differenzpuls Polarographie vorteilhaft gegenüber der Rechteck Technik. Das Signal von DF liefert größere Nettoströme verglichen mit DQ und PQ. Der Untergrundstrom ist um drei Größenordnungen erhöht gegenüber der Basislinie im Potentialbereich von -0,3 bis -0,7 V, in dem die elektrochemische Aktivität von PQ und DQ einsetzt.

Die Halbstufenpotentiale betragen bei den Messungen im Batch - 470 mV (DQ), -490 mV (PQ), und -1480 mV (DF) vs. Ag/AgCl. Im Batch konnten die Signale von DQ, PQ und EQ eindeutig von DF getrennt werden. Für voltammetrische Signale kommt eine Beurteilung der Auflösung, wie sie für Gauss- und linienförmige Signale möglich ist, nicht in Frage. Folgende Handhabung wird für die Beurteilung von Peaküberlappungen vorgeschlagen [115]: Man vergleicht die Differenz zwischen beiden Halbstufenpotentialen $\Delta E_{1/2}$ mit der Summe der beiden Peakbreiten ΣU_{width} , wobei die Peakbreite auf Höhe der Wendepunkte des Peaks bestimmt wird. Als eine zulässige Interferenz für quantitative voltammetrische und polarographische Bestimmungen wird angenommen, wenn der Wert für $\Delta E_{1/2}$ mehr 90 % des Wertes ΣU_{width} einnimmt. Als kritisch wird ein Wert zwischen 60 und 90 % befunden. Für quantitative Analysen nicht mehr nutzbar ist ein Faktor von 40 %. Diese Faktoren basieren auf den Quellen [116-119]. Für die Rechteck-polarographische Bestimmung von DQ und PQ (Abb. 4.3.a) ergab sich ein Faktor von 15 % und für die differentielle pulspolarographische Bestimmung

(Abb. 4.3.b) 14 %. Damit ist eine chromatographische Trennung für eine elektrochemische Bestimmung der beiden Herbizide obligat.

Untersuchung der Untergrundstörung bei ca. -1,9 V

Die folgenden Versuche wurden mit der Meßanordnung I und mit Differenzpuls Polarographie durchgeführt.

Abbildung 4.5 zeigt den Untergrundstromverlauf und das Analytsignal von 9 µg/mL DF. Bei ca. -1,8 V ist ein exponentieller Anstieg des Grundstromes aufgrund der Wasserstoffabscheidung zu erkennen. Bei ca. -1,6 V erscheint ein lokales Maximum, auf dem als Schulter der DF-Peak sitzt. Legt man einen Anstieg des Untergrundstroms zugrunde, der nur durch die H₂-Welle verursacht wird (theoretischer Verlauf), könnte DF störungsfrei detektiert werden. Die Ursache des lokalen Maximums ist unbekannt. Auch ohne Anwesenheit von DF in der Lösung tritt die Störung auf, es besteht also kein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Signalen.

Zunächst sollten Verunreinigungen im Elektrolyten als Ursache für das störende Signal ausgeschlossen werden. Deshalb wurden sukzessive die Komponenten des Elektrolyten (= Elutionsmittel) ausgetauscht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.6 zu sehen. Mit Verringerung der Massenanteile der gelösten Reagentien konnte auch die Störung verringert werden. Der

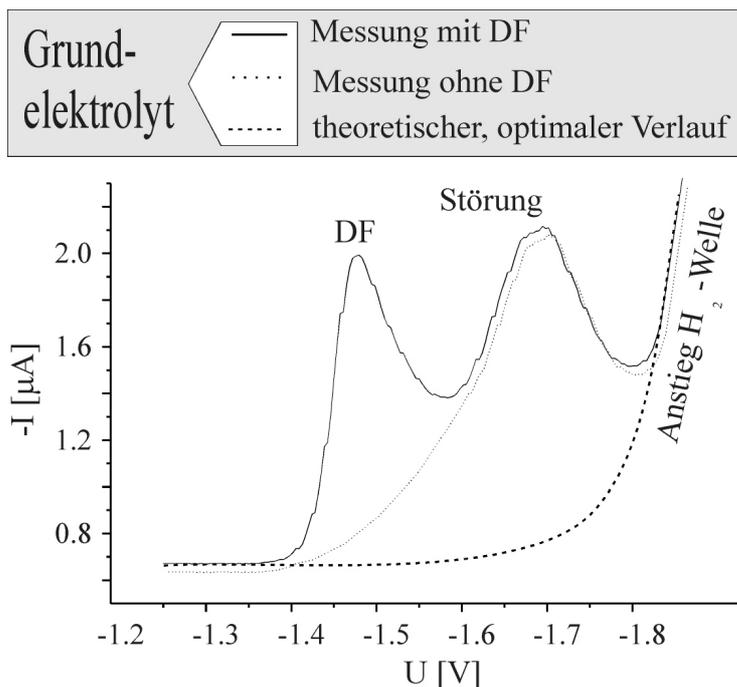


Abb. 4.5: DP-Polarogramme von DF und dem reinen Grundelektrolyten

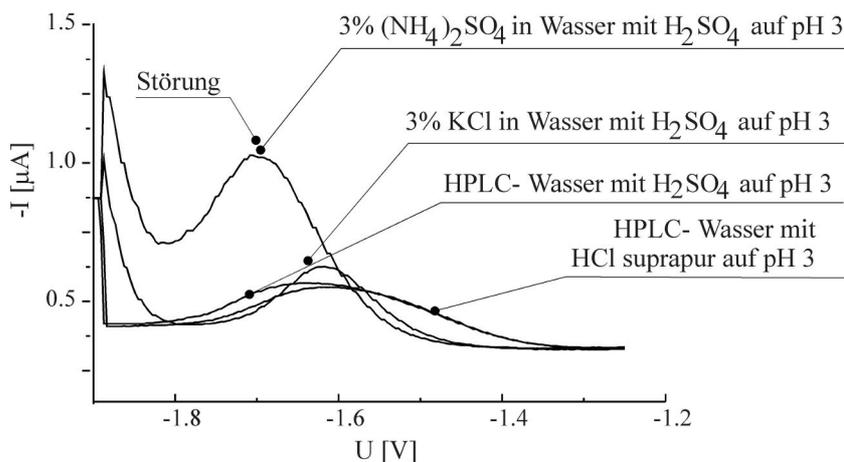


Abb. 4.6: DP-Polarogramme unter Variation der Grundelektrolytzusammensetzung

Anstieg des Grundstromes konnte jedoch keiner einzelnen Komponente zugeordnet werden. Selbst HPLC-Wasser mit einem Tropfen HCl Suprapur (beide: Merck, Darmstadt) angesäuert zeigte noch einen geringen Anstieg.

Ein weiterer Ansatz bestand darin, die Störung durch Variation des pH-Wertes zu unterdrücken. Dazu wurde der Eluent auf verschiedene pH-Werte eingestellt und die Signalhöhe der Störung, sowie des Analyten beobachtet. In Abbildung 4.7 ist zu sehen, daß die Störung bei Steigerung des pH-Wertes unterdrückt wurde. Denselben Einfluß hatte die pH-Wert-Variation auch auf das Analytsignal. Zuletzt wurde der Methanolgehalt des Elektrolyten variiert. Auch hier ging eine Signaldepression der Störung mit einer Verringerung des Analytsignales einher (Abb. 4.8).

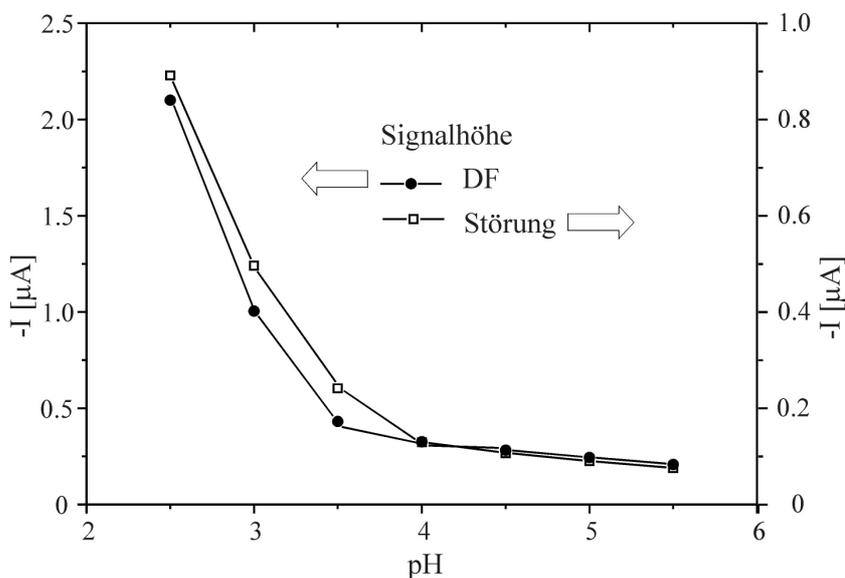


Abb. 4.7: Signalhöhen von DF (9 µg/mL) und der Störung unter Variation des pH-Wertes des Grundelektrolyten

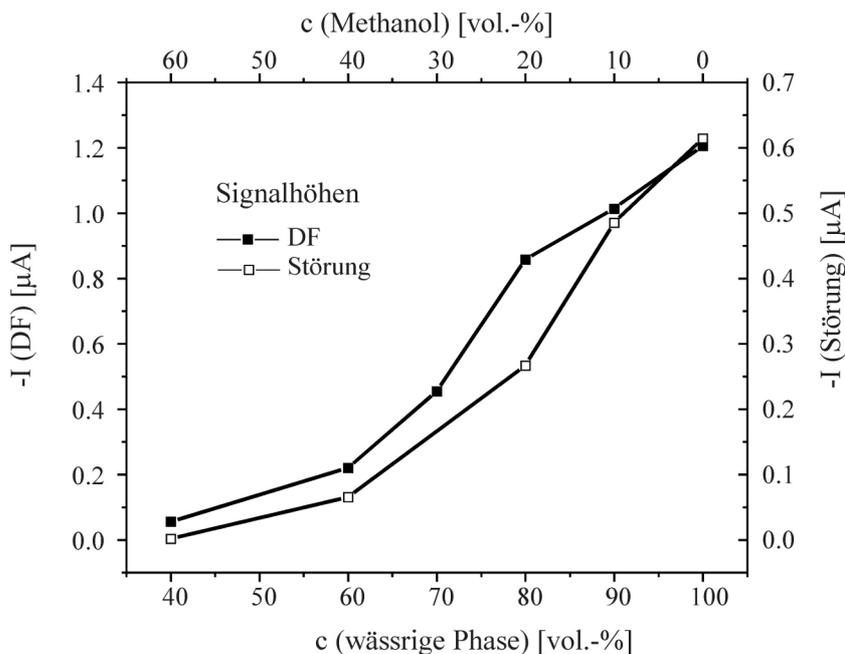


Abb. 4.8: Signalhöhen von DF (9 µg/mL) und der Störung unter Variation der Zusammensetzung des Grundelektrolyten

Es konnten also keine Bedingungen gefunden werden, die die Stromhöhen der Störung gezielt und unabhängig von denen des Analyten beeinflussen.

Als weitere eventuelle Ursache wurde die Quecksilberqualität überprüft. Das Quecksilber (bisher: Degussa, analysenrein mit 99,99995 %) wurde ausgetauscht gegen Quecksilber von Merck für Analyse und für die Polarographie, bei der der Gehalt an Pb, Cu, Ni, Fe, Mn, Cd, Zn und Tl insgesamt kleiner 0,0003 % ist. Es wurde keine Auswirkung auf den Grundlinienverlauf im Potentialfenster von -1,2 V bis -1,8 V festgestellt.

Grundelektrolyt mit Zusatz oberflächenaktiver Substanzen

Adsorptiv wirksame Substanzen, wie z. B. Triton X oder Gelatine sollen, nach der Theorie von Walcarius und Lamberts [97], die Elektrodenoberfläche belegen, so daß die Adsorptionsplätze für den in wesentlich geringeren Konzentrationen vorkommenden Analyten

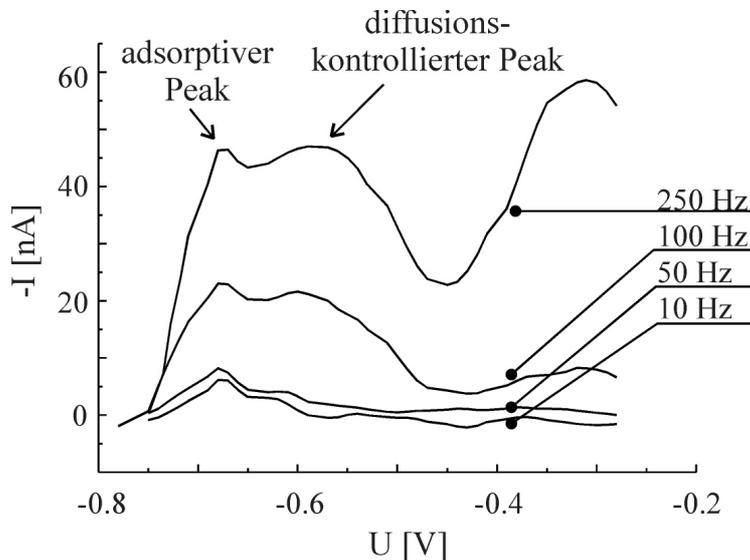


Abb. 4.9: Abhängigkeit der Adsorptionspeakhöhe von der Modulationsfrequenz; hier unter Verwendung einer Lösung von 15 mg/mL PQ im Eluenten ohne Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen

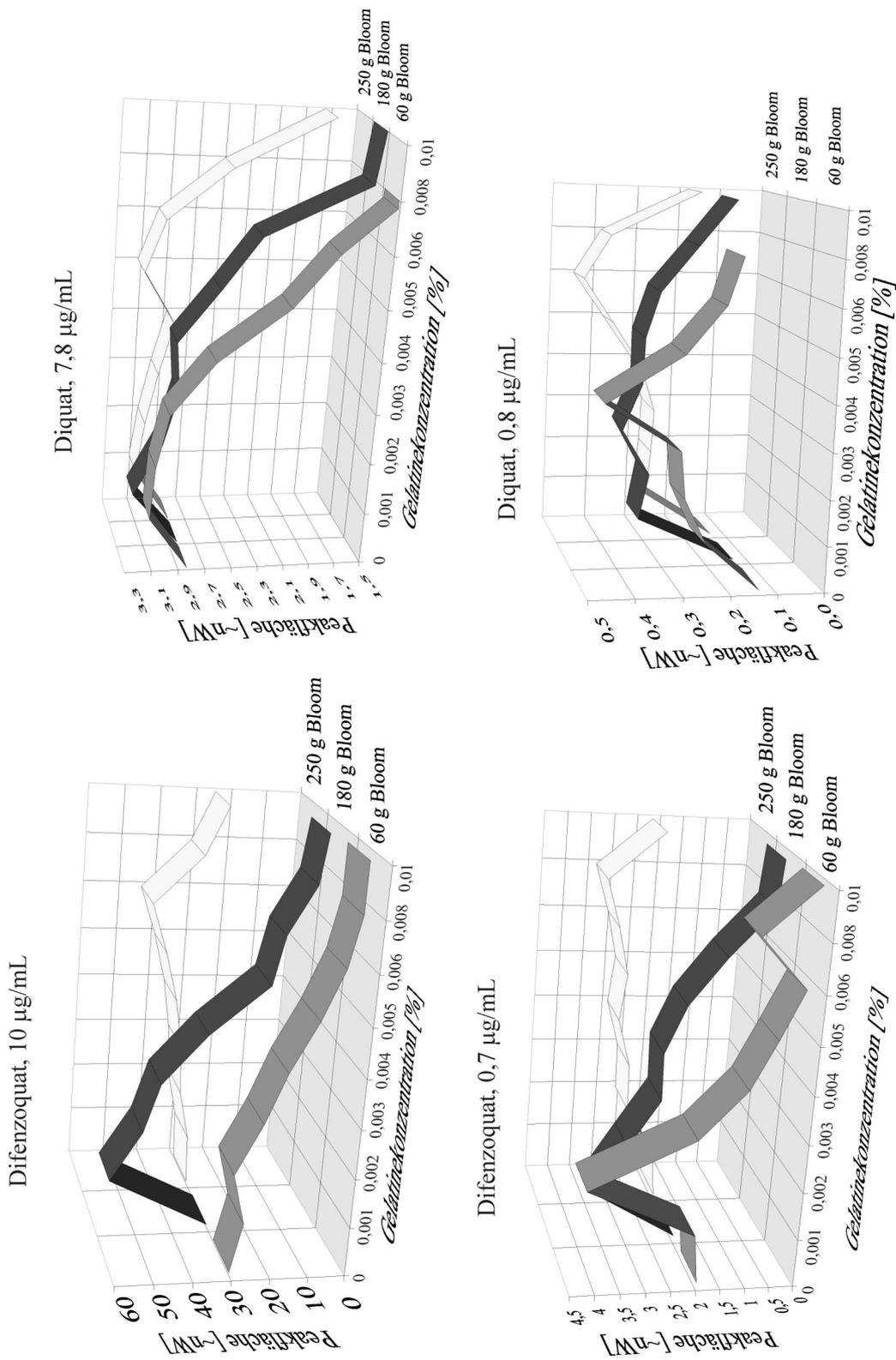


Abb. 4.10: Peakflächen für DF und DQ versus Gelatinekonzentrationen und Bloomhärte. Die Daten für DF sind untergrundkorrigiert (der gemessene Strom, und somit die Peakfläche ist proportional zu der Spannung, die von der AD-Wandlerkarte ausgegeben wird, auf eine Skalierung wurde hier verzichtet.)

bereits besetzt sind. Die Ladung, die mit der adsorbierten Spezies umgesetzt wurde, soll bei Eliminierung der adsorptiven Prozesse bei der diffusionskontrollierten elektrochemischen Reaktion umgesetzt werden und dieses Signal erhöhen.

Mit der Meßanordnung II wurden Rechteck voltammetrische Messungen durchgeführt, um den adsorptiv kontrollierte Peak von PQ zu erhalten. Die Aufspaltung des Rechteck voltammetrischen Signals von PQ in einen adsorptiven und in einen diffusionskontrollierten Peak, wie von den beiden Autoren beschrieben, konnte bei kleinen Pulsamplituden (2 mV) und hohen Analytkonzentrationen (15 µg/mL) beobachtet werden (Abb 4.9). Das Verhältnis der Peakhöhen von adsorptiven zu diffusionskontrolliertem Peak nimmt mit steigenden Frequenzen der Rechteck Amplitude sichtbar zu.

Für die Messungen unter Zusatz oberflächenaktiver Substanzen zum Grundelektrolyten (HPLC-Eluent) wurde die Meßanordnung II verwendet und als Elektrode wurde die HMDE eingesetzt. Es wurden für DQ ($c = 0,7 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$) und DF ($c = 0,8 \mu\text{g/mL}$ und $7,8 \mu\text{g/mL}$) Triton X 100 und Gelatine in den Bloom-Härten 60 g, 180 g und 250 g in Konzentrationen von 0 bis 0,01 % dem Elektrolyten zugesetzt. Die Bloomhärte ist ein Maß für die Gelierfähigkeit der Gelatine und trägt die Einheit Gramm. Es ergab sich eine Gesamtzahl von 120 Messungen. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse für DQ und DF. Die Peakintensitäten von DF in hoher und niedriger Konzentration und DQ in hoher Konzentration nehmen mit steigender Gelatinekonzentration im Elektrolyten ab. Einen eindeutigen Einfluß der Gelatinekonzentration auf die Signalintensität von DQ in geringen Konzentrationen läßt sich nicht erkennen. Da sich diese Meßserie im Bereich der Nachweisgrenze bewegt, werden eventuell vorhandene schwache Tendenzen hier durch geringe Reproduzierbarkeit der Bestimmung überlagert. Die Meßserien, die unter Variation der Bloomhärte durchgeführt worden waren, ergaben parallele Verläufe, die Bloomhärte hatte keinen entscheidenden Einfluß auf die Signalthöhe.

Reproduzierbarkeit der HMDE

Einen wichtigen Einfluß auf die Gesamtproduzierbarkeit der chromatographischen Bestimmung mit on-line scannender voltammetrischer Detektion an der HMDE hat die reproduzierbare Herstellung der HMDE. Über die Reproduzierbarkeit in der Herstellung der HMDE sind keine Daten erhältlich. Um diese prüfen zu können, wurde ein Verfahren angewendet, das Babel vorschlug, um die Tropfenmasse und -oberfläche in Abhängigkeit von der Ventilöffnungszeit zu bestimmen [42].

Mit dem VA Stand 694 und dem VA Prozessor 693 wurden mit der Tropfengröße 9 eine HMDE in einem leeren Gefäß erzeugt, mit der Hand abgeschlagen und gewogen. Für die

Wägung wurde eine mechanische Analysenwaage Typ B5 (Mettler, Zürich - Schweiz) verwendet mit einer Ablesbarkeit von $\pm 0,05$ mg und einer Reproduzierbarkeit der Resultate von $\pm 0,03$ mg. Die Anzahl der Wiederholungen (n) betrug 10.

Die mittlere Tropfenmasse betrug 0,47 mg, die Standardabweichung betrug 0,024 mg und die relative Standardabweichung betrug 5,2 %. Die Standardabweichung lag demnach im Schwankungsbereich der Waage. Es ist demnach nur eine positive Aussage möglich, nach der die Standardabweichung 6 % nicht überschritt. Für eine in der Spurenanalytik relevante Aussage wäre hier eine Waage mit größerer Präzision notwendig gewesen, um kleinere Standardabweichungen feststellen zu können.

4.1.4 Optimierung der Durchflußzelle für HPLC-HDVD

Die HMDE in der EFTA

Für die ersten Versuche on-line scannender Voltammetrie als Detektionsmethode für die HPLC wurde die Meßanordnung II, bestehend aus einem VA-Stand 694 und VA-Prozessor 693 (Metrohm, Herisau) verwendet. Die Batch-Zelle im Meßstand wurde durch einen **Electrochemical Flow-Through trace Analyzer (EFTA)** der Firma Metrohm ersetzt. Diese Durchflußzelle gleicht der Architektur einer Dünnschichtzelle (Abbildung 3.6.c, Seite 23). Die EFTA wurde so eingebaut, daß zuerst die Referenz-, dann die Arbeits- und dann die Gegenelektrode angeströmt wird, so daß Produkte, die an der Gegenelektrode entstehen, nicht die Detektion an der HMDE störten. Die HPLC-Anlage entsprach der auf den Seiten 43-44 beschriebenen Anlage. Einen Überblick auf diese Konfiguration bietet Abbildung 4.11. Der UV-Detektor wurde vor den elektrochemischen Detektor geschaltet, um Störungen durch Reaktionsprodukte zu vermeiden. Die elektrochemische Detektion sollte durch die Reihenschaltung beider Detektoren nicht negativ beeinflusst werden [120]. Der Eluent wird durch Sprudeln mit Argon von gelöstem Luftsauerstoff befreit (Beginn mindestens zwei Stunden vor der ersten Analyse und mit leichtem Strom auch während der Analysen) und die Verwendung von Kunststoffen mit minimaler Sauerstoffpermeabilität verhindert ein Wiedereindringen des Sauerstoffs in das System. Die Wirksamkeit der Sauerstoffentfernung konnte einfach

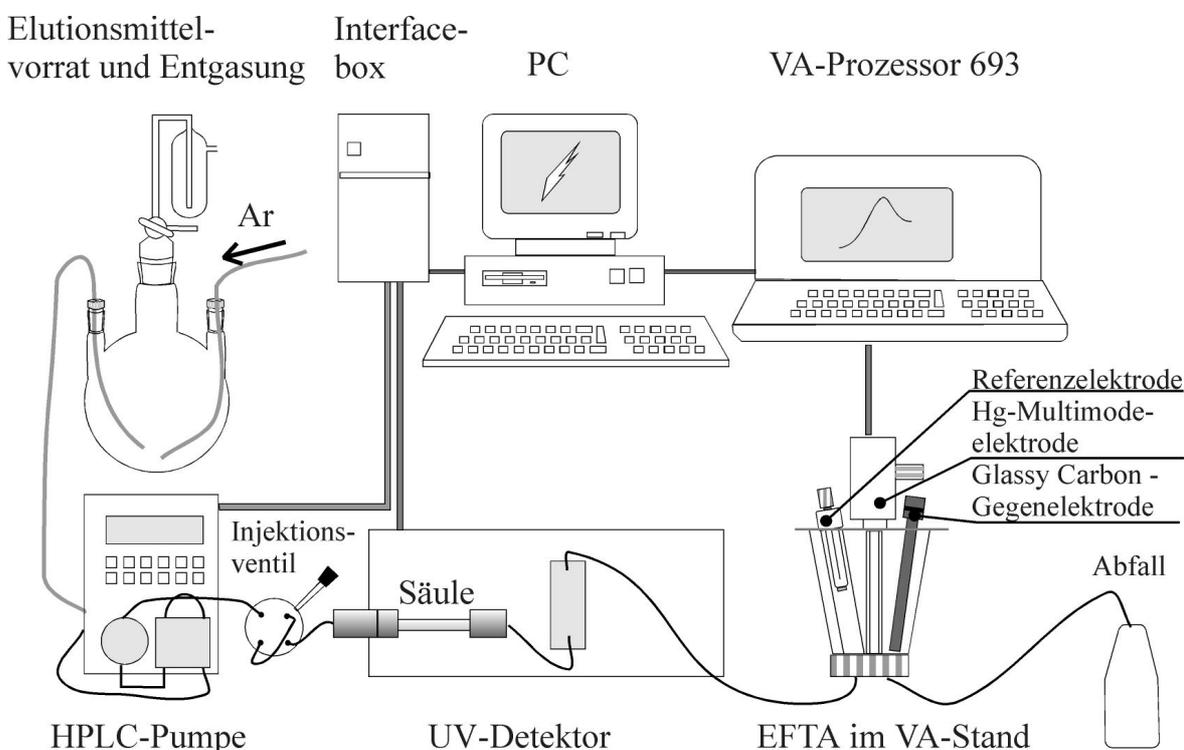


Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Meßanordnung

mit amperometrischer Detektion bei -1 V an der HMDE geprüft werden. Die Maßgabe war hierbei, 100 nA Grundstrom zu erreichen und einen stationären Zustand zu erzielen.

Um den störenden Einfluß des Luftsauerstoffs aus den Proben einschätzen zu können, wurde zunächst unbehandelter Eluent injiziert und amperometrisch detektiert. Dann wurde der Eluent fortlaufend mit leichtem Argonstrom entgast und Proben in kurzen Abständen injiziert. Der Sauerstoff eluierte nach ca. 2 min, was dem Totvolumen entsprach und konnte durch 5 Minuten Entgasen soweit entfernt werden, daß er bei -1 V nicht mehr detektierbar war.

Für die scannende voltammetrische Detektion wurden folgende Bedingungen und Parameter eingestellt:

Als elektrochemisch analytische Methode wurde Differenzpuls Voltammetrie mit 50 mV Pulshöhe gewählt. Das Spannungsfenster lag zwischen -450 mV und -850 mV für PQ, DQ und EQ; für DF wurde ein Potentialfenster zwischen -1250 mV und -1650 mV gewählt. t_{mess} betrug 16,6 ms; t_{step} 0,1 s und U_{step} 12 mV. Die Tropfengröße betrug 4 (diese dimensionslose Angabe entspricht einer Tropfenoberfläche von 0,2 mm²). Aus der Stufenhöhe und -breite ergab sich eine Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 120 mV/s.

Die Automatisierung des Scannens wurde über die Software des VA-Prozessors gesteuert. Hierzu werden die Spannungsrampen in Wiederholungsschleifen eingebettet. Der VA-Prozessor kann maximal 60 Spannungsrampen ausführen [115]. Programme, die Anweisungen für mehr Rampen enthielten, wurden nach der Ausführung von 60 Rampen abgebrochen. Hierin lag eine wesentliche Limitation in der Verwendung des VA-Prozessors für die on-line Analytik: Die Aufnahme der Datenmenge war durch diese Hard- und Softwarerestriktion stark eingeschränkt. Zwar konnte man die Dauer einer Rampe erweitern, jedoch war dann die Abtastrate einer bestimmten Spannung bezüglich der Retentionszeit zu gering. Die Datenmenge konnte nur durch Abspeichern der Daten und Neustart der Methode erweitert werden. Auch die Wahl eines anderen Potentialfensters für die Detektion von DF machte eine Unterbrechung der Messung für den Start einer anderen Methode notwendig. Bei dieser Methode entstand eine Lücke in der Datenaufnahme von ca. 45 Sekunden. Zwar ist das Betriebssystem des VA-Prozessors nach mündlicher Mitteilung des Herstellers multitaskingfähig (das bedeutet, mehrere datenverarbeitende Prozesse können gleichzeitig ablaufen), er sollte demnach gleichzeitig speichern und messen können. Dieses konnte in der Praxis nicht bestätigt werden. Die Unterbrechung der Messungen durch Zwischenspeichern der Daten machte eine ständige Beaufsichtigung der Detektion notwendig.

Die Einengung der Potentialfensterweite auf 400 mV war notwendig, um eine hinreichende Abtastrate bei einer diskreten Spannung bezüglich der Retentionszeit zu erreichen. Die

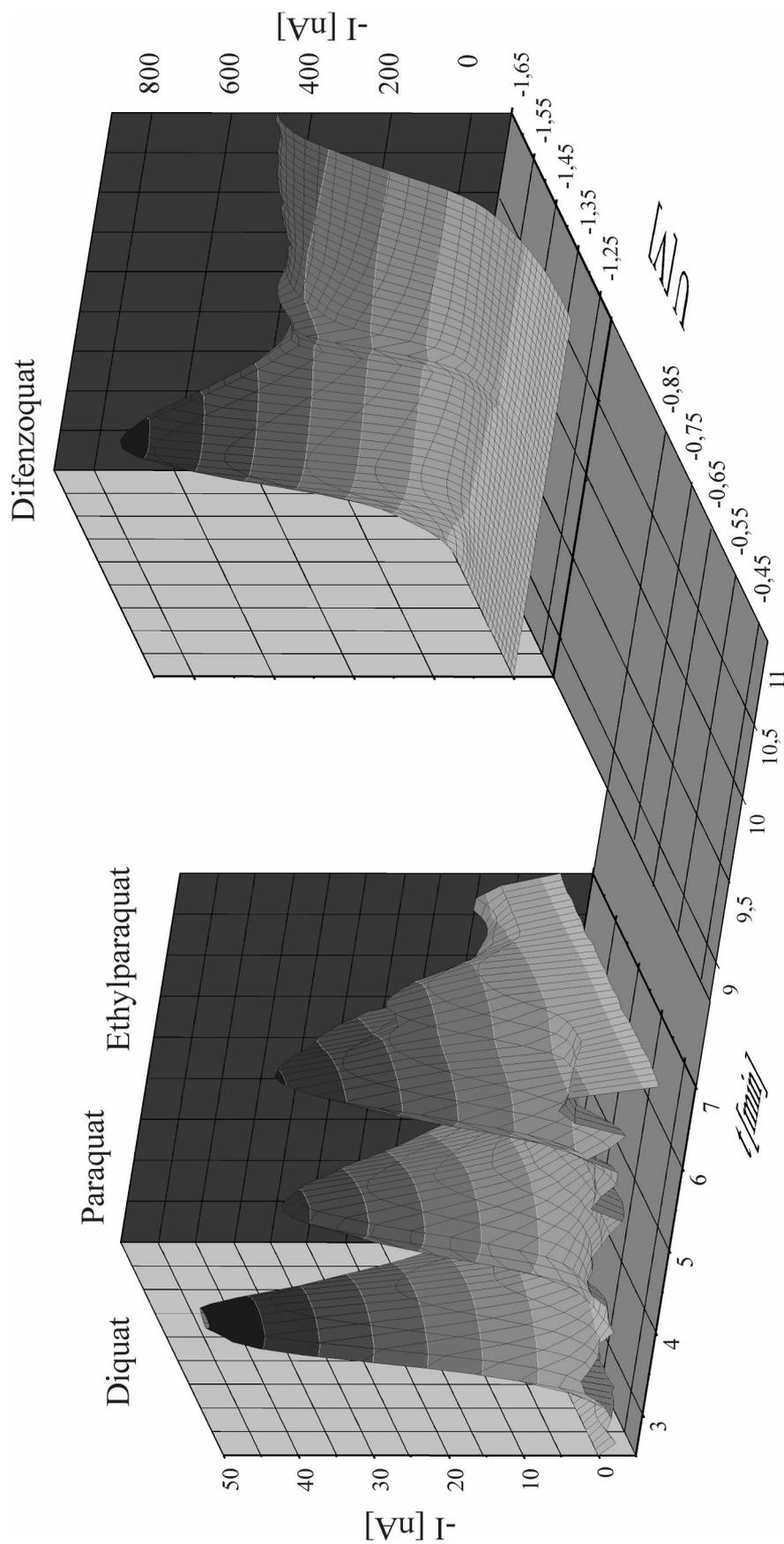


Abb. 4.12: Chromatogramm der vier quaternären Ammoniumverbindungen ($c_{DQ} = 37 \mu\text{g/mL}$, $c_{PQ} = 44 \mu\text{g/mL}$, $c_{EPQ} = 64 \mu\text{g/mL}$) mit HPLC-HDVD; Messmethode: DPV am hängenden Quecksilbertropfen; Meßzelle: EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur

maximale Scangeschwindigkeit, die der VA Prozessor für differentielle Messtechniken erlaubte, betrug 240 mV/s. Hier arbeitete der Potentiostat jedoch am Rande seiner Leistungsfähigkeit, was sich in erhöhtem Detektorrauschen bemerkbar machte.

Abbildung 4.12 zeigt ein Chromatogramm, das unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen werden konnte. Die Messungen für DF sind untergrundkorrigiert. Hierfür wurde von den on-line Voltammogrammen ein Voltammogramm subtrahiert, das außerhalb des Elutionsvolumens von DF aufgenommen wurde. Um die quaternären Ammoniumverbindungen mit diesem System sicher detektieren zu können, wurde ein Standard mit Analytkonzentrationen von 34 $\mu\text{g/mL}$ bis 64 $\mu\text{g/mL}$ eines jeden Analyten eingesetzt. Für die Detektion von DF wurde eine neue HMDE generiert, was zunächst durch die Programmstruktur bedingt war, aber auch - wie sich erwies - eine wesentlich empfindlichere Detektion von DF erlaubte.

Die Daten wurden vom VA Prozessor blockweise, was durch die Meßprogrammstruktur bedingt ist, im ASCII-Format abgespeichert. Diese ließen sich dann zu einer Datenmatrix zusammenfassen, die mit Origin (MicroCal Inc., Northampton - USA), Excel (Microsoft Corporation) und Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin) verarbeitet werden konnte.

Probleme traten mit der kurzen Lebensdauer der HMDE auf. Der Quecksilbertropfen fiel oft nach kürzester Zeit (2 min) ab. Eine längere Beständigkeit als 60 min wurde nur in Ausnahmefällen beobachtet. Die Lebensdauer der HMDE hing stark von der Glaskapillare ab, die gerade verwendet wurde. Alle Glaskapillaren, welche als Wegwerfprodukt konzipiert worden sind, sind Unikate und für die Justage der Multimodeelektrode mit Glaskapillare im Gehäuse sind keine Bezugspunkte vorgesehen, so daß der Einbau der Kapillaren nicht reproduzierbar war.

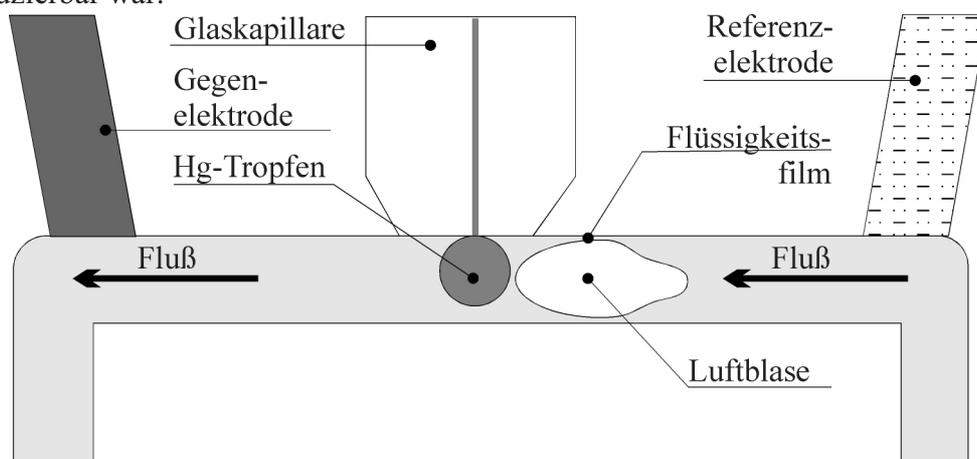


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der Detektorzelle EFTA mit einer HMDE und Luftblase, die den Kontakt zur Referenzelektrode unterbricht

Weiterhin gab es Schwierigkeiten mit Gasblasen, die sich in der Detektorzelle sammelten. Diese konnten die Zelle nicht ohne Entfernung der HMDE und somit einer Unterbrechung der Messung aus der Meßzelle entfernt werden. Die Situation wird in Abbildung 4.13 veranschaulicht: Die HMDE blockiert das Austreten der Gasblase. Die in der HPLC häufigste Ursache für das Ausgasen sind im Eluenten gelöste Gase, die bei Abbau des Druckes nach der Trennsäule wieder in die Gasphase übergehen. Dies ist hier auszuschließen, da der Eluent optimal von gelösten Gasen befreit wurde. Die Injektion von Luftblasen wurde mit äußerster Sorgfalt vermieden. Auch daß Luft in die Detektorzelle durch Undichtigkeiten eintrat, war unwahrscheinlich, da der Eluent dort noch unter einem geringen Überdruck stand. Der Ursprung dieser Gasblasen konnte nicht geklärt werden.

Folgende instrumentelle Probleme standen demnach einer Anwendung dieser Analytik für die Herbizide mit HPLC-HDVD mit dieser Versuchsanordnung entgegen:

- Die hohen Konzentrationen an Analyten, die für die Detektion notwendig waren
- Die schlechte Automatisierbarkeit der Analyse
- Die in die Detektorzelle eindringende Luft
- Die kurze Lebensdauer der HMDE

Die HMDE in der W-Kanal EFTA und silanisierte Kapillaren

Die oben vorgestellten Ergebnisse waren unter anderem ein Anstoß für die Firma Metrohm, die Zellenarchitektur der EFTA weiter zu entwickeln. Das neue Zeldesign (Abbildung 4.14) findet mit einem schrägen Einfallswinkel des Eluenten genau den Kompromiss zwischen den ungünstigen Winkeln von 90° und 180° . Die Zelle hat ein wirksames Zellvolumen von

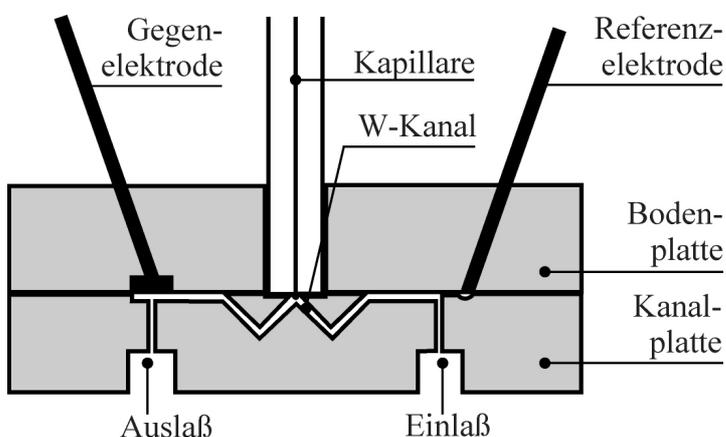


Abb. 4.14: Schematische Darstellung der W-Kanal EFTA für die Anwendung der HMDE in fließenden Systemen

400 nL. Weiterhin gelangten zeitgleich silanisierte Glaskapillaren zur Serienreife, so daß die W-Kanal EFTA ausgestattet mit silanisierten Glaskapillaren getestet werden konnte.

Durch die Verbesserung der Zellarchitektur und den Einsatz silanisierter Glaskapillaren wurde die HMDE für die elektrochemische HPLC-Detektion einsetzbar.

Getestet wurde zunächst die Lebensdauer der HMDE in einem Fluß von 0,7 mL/min und einer Arbeitsspannung von -1 V. Diese überschritt regelmäßig 60 min. Kurzfristiges Abfallen des Tropfens nach nur wenigen Minuten wurde nicht beobachtet.

Die Verwendung der Quecksilberfilm Elektrode (mercury film electrode MFE) in der elektrochemischen HPLC-Detektion

Für den Einsatz der MFE wurde elementares Quecksilber aus einer Lösung mit 20 mg/L Hg^{2+} und 1 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} auf einer Glaskohle Scheibenelektrode (\varnothing 3 mm) abgeschieden. Die Kupferspuren dienen als Kristallisationskeime für das elementare Quecksilber. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit einem Fluß von 0,7 mL/min durch die Detektorzelle gepumpt. Während die Lösung floß, steuerte der VA Prozessor 693 ein Spannungsprogramm. Dabei diente der erste Block, der ein Arbeitspotential von 700 mV und 50 mV Pulsen beinhaltete, gefolgt von einer Spannungsrampe von 100 bis 700 mV (\dot{a} 120 mV/s) und 10 Rampen von 200 bis 600 mV/s zunächst der Reinigung der Glaskohlenstoffoberfläche. Im zweiten Block wurde die Oberfläche durch Keimbildung mit Kupfer und Quecksilber aktiviert durch Anlegen von 50 Spannungsrampen von -700 bis -100 mV. Dann wurde für die Abscheidung des Films 400 Sekunden lang eine Spannung von -900 mV aufrecht erhalten. Eingeschlossene metallische Verunreinigungen wurden durch einen weiteren Block mit Rampen von -800 bis -100 mV entfernt. Die Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten betragen 1 V/s und 10 V/s, falls nicht anders angegeben. Diese hohen Geschwindigkeiten wurden

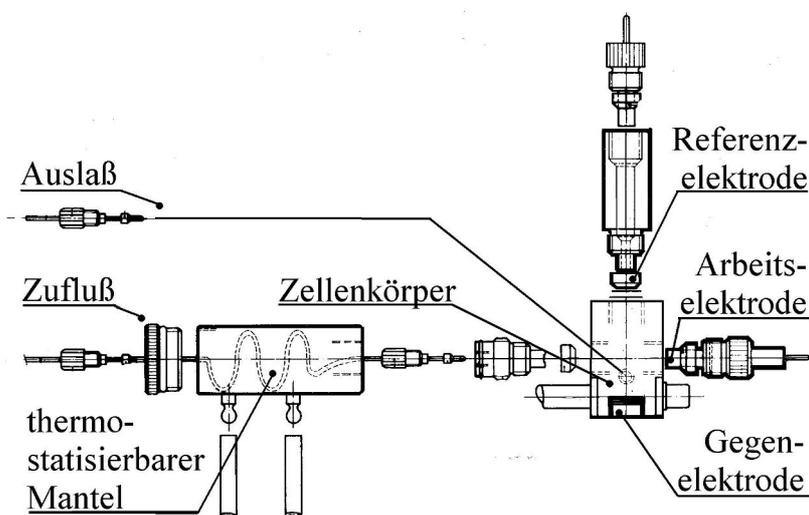


Abb. 4.15: Explosionszeichnung der Wall-Jet Zelle. Als Arbeitselektrode wurde eine MFE auf Basis einer Glaskohle Elektrode (\varnothing 3mm) verwendet, als Referenzelektrode eine Ag/AgCl (3 mol/L KCl) und als Gegenelektrode eine Goldelektrode.

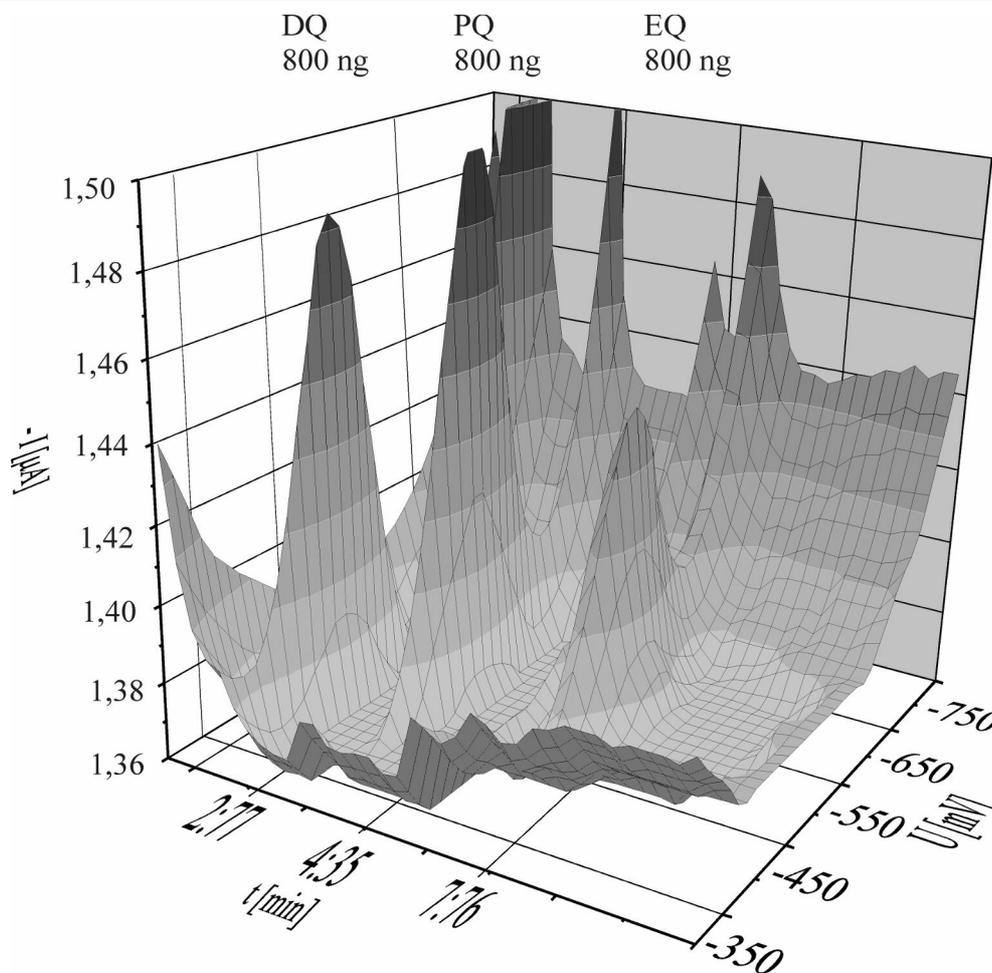


Abb. 4.16: HPLC-HDVD Chromatogramm mit Differenzpuls Voltammetrie als Detektionsmethode, MFE in der herkömmlichen EFTA, Meßanordnung II. Die injizierte Menge von 80 ng entspricht einer Konzentration von 40 µg/mL pro Analyt

mit dem “condc”-Befehl realisiert. Nach Beendigung des Potentialprogrammes wurde der Fluß der Schwermetalllösung gestoppt und die Zelle für ca. 5 min mit einem Fluß von 0,7 mL/min mit Eluent gespült.

Die Parameter zur Herstellung der MFE wurden dem Applikations Bulletin Nr. 258/1d (Metrohm, Herisau) entnommen [121]. Als Detektorzellen kamen die EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur und die Wall-Jet Zelle (Abb. 4.15) zum Einsatz. Die Elektroden wurden mit dem VA Prozessor 693 angesteuert. Das chromatographische System aus Kapitel 4.1.2 wurde unverändert eingesetzt.

Der Quecksilberfilm war als leichter Grauschleier auf der Glaskohlenstoffoberfläche zu erkennen. Die Funktionsfähigkeit ließ sich jedoch visuell nicht überprüfen. Die Abbildungen 4.16 und 4.17 zeigen ein Chromatogramm, das mit der MFE aufgenommen wurde. Die Auftragung der Messdaten in Form eines Contour Plots erleichtert die Auswertung. Mit der Software Origin (Microcal Software, Northhampton - USA) kann die Hyperfläche mit einem

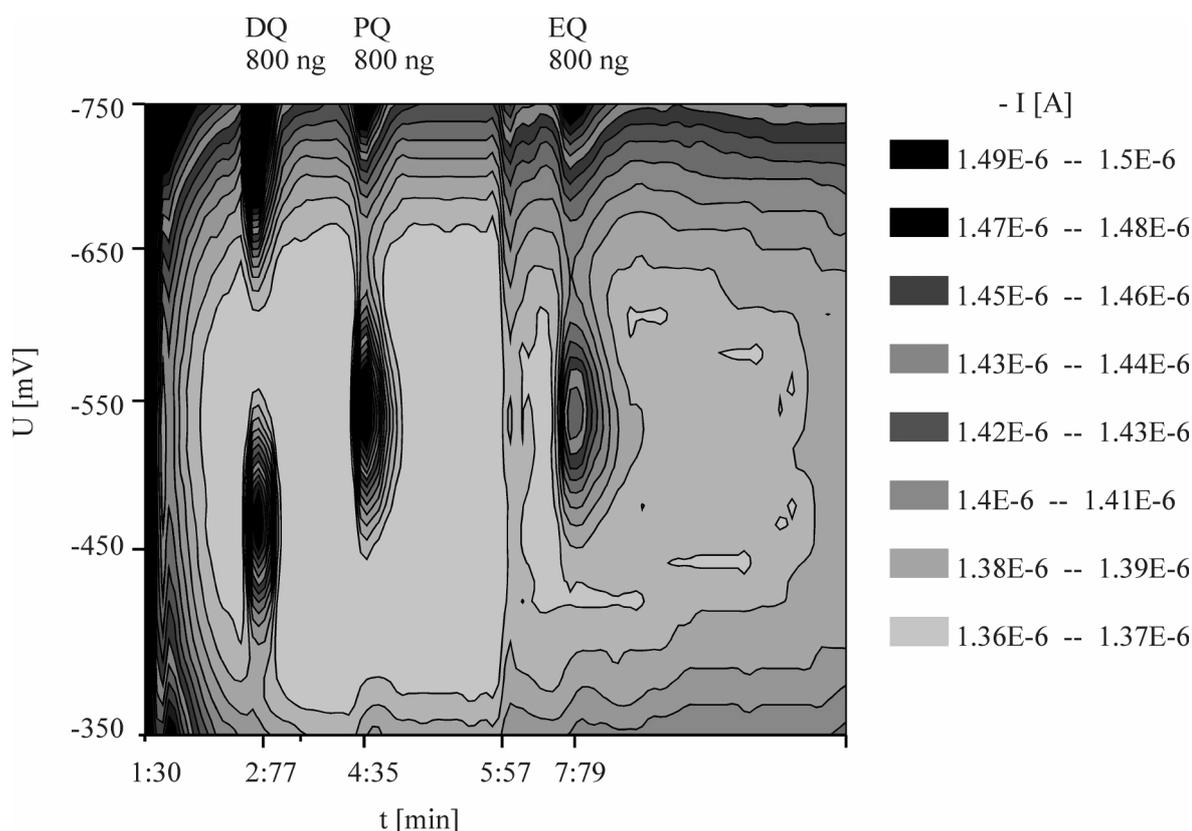


Abb. 4.17: Darstellung eines HPLC-HDVD Chromatogramms mit Differenzpuls Voltammetrie als Detektionsmethode als contour plot. Der Datensatz ist identisch mit dem in Abb. 4.15 dargestellten. Die injizierte Menge von 80 ng entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$ pro Analyt

Werkzeug abgetastet werden, um die Maxima zu bestimmen. Es wurde hier das Peakpotential bestimmt und ein zweidimensionales Chromatogramm beim Peakpotential aus der Datenmatrix entnommen. Das entspricht dem Vorgehen bei der Auswertung von Diodenarray-Chromatogrammen. Die Halbstufenpotentiale betragen in der EFTA -470 mV (DQ) sowie -550 mV (PQ und EQ) und in der Wall-Jet Zelle -610 mV (DQ) sowie -690 mV (PQ und EQ) vs. Ag/AgCl (3 mol/L KCl). Bei diesen Spannungen wurden die gemessenen Ströme gegen die Scan-Nummer aufgetragen, die Scan-Nummer ist proportional zu der Retentionszeit. Auf eine Umrechnung der Scan-Nummern in Retentionszeiten wurde z.T. verzichtet, so daß eine quantitative Auswertung der HPLC-HDVD Chromatogramme auch in den folgenden Kapiteln stets über Peakhöhen und somit über die Ströme erfolgte.

Aus den Abbildungen 4.16 und 4.17 sind deutlich die zweiten Reduktionsstufen von Diquat, Paraquat und Ethylparaquat als Anstieg bei -750 mV zu erkennen. Die Ströme lagen im μA -Bereich und sind damit um den Faktor 10 gegenüber der Detektion der Quats an der HMDE mit der gleichen voltammetrischen Technik erhöht. Eine vergleichende Messung an der Glaskohle Elektrode ohne Quecksilberfilm im gleichen Potentialfenster konnte nicht durchgeführt werden, da der Strom-Meßbereich des VA Prozessors überschritten wurde, so daß

die Abscheidung des Quecksilberfilms eine erhebliche Absenkung des Grundstroms gegenüber der unbehandelten Oberfläche bewirkte. Die MFE lag in ihren Eigenschaften zwischen reiner Quecksilber- und Glaskohle Elektrode.

Mit der MFE in einer Wall-Jet Zelle oder der herkömmlichen EFTA konnten erstmals Daten zur Reproduzierbarkeit der Messungen durchgeführt werden. Hierzu wurde in Abständen eine Standardlösung mit 40 µg/mL eines jeden Herbizids injiziert und Chromatogramme mit differenzpulsvoltammetrischer Detektion aufgenommen. Über Nacht wurde der Elutionsstrom gestoppt, es wurden keine besonderen Maßnahmen zur Stabilisierung (z. B. Anlegen einer Spannung) ergriffen.

Tabelle 4.3: Peakhöhen, Standardabweichungen (standard deviations, sd) und relative Standardabweichungen (rsd) aufeinanderfolgender chromatographischer Läufe für DQ und PQ mit Differenzpuls Voltammetrie an der MFE

Nr.	EFTA		Wall-Jet			
	Alter der Elektrode [min]	Peakhöhe - I [nA]		Alter der Elektrode [min]	Peakhöhe - I [nA]	
		DQ	PQ		DQ	PQ
1	24	210	155	30	1585	923
2	106	138	118	53	715	624
3	116	203	141	65	625	580
4	125	218	158	78	661	595
5	152	188	175	91	701	571
6	172	275	191	103	712	572
7	183	221	176	114	661	577
8	196	226	170	125	639	559
9				136	701	570
10				22,5 h	530	551
11				3,9 Tage	774	717
12				4,8 Tage	648	408
Mittelwert		210	161		669*	575*
sd		39	23		63*	72*
rsd		18 %	14 %		9 %*	13 %*

* Der erste Wert wurde für die Mittelung anhand des Ausreißertests nach Dörffel S. 125 [111] auf einem Signifikanzniveau von 0,95 eliminiert

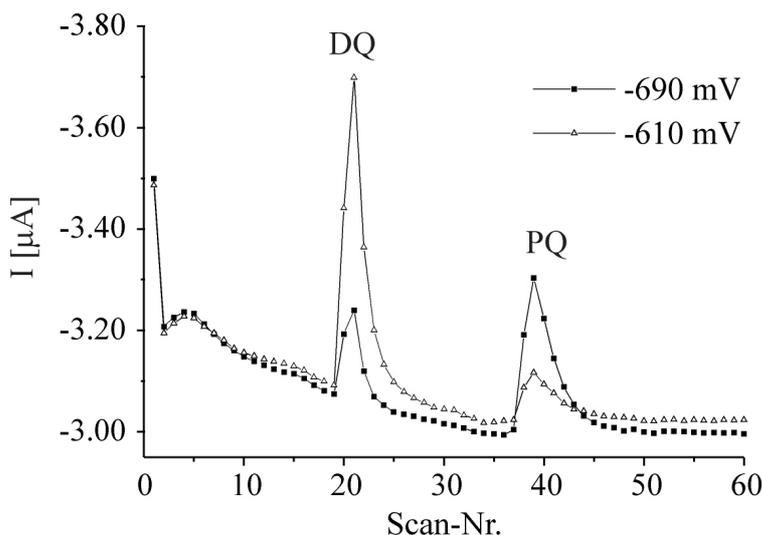


Abb. 4.18: Chromatogramm der beiden quaternären Ammoniumverbindungen in einer Konzentration von je 25 µg/mL aufgenommen mit Differenzpuls Voltammetrie an der MFE in der Wall-Jet Zelle. Die Scan-Nummer ist proportional zur Retentionszeit

Die Standardabweichungen aus der Auswertung über die Peakflächen ergaben für die EFTA 20 % (DQ) und 18 % (PQ) sowie 44 % (DQ) und 30 % (PQ) für die Wall-Jet Zelle. Die Standardabweichungen waren sehr hoch für ein analytisches Verfahren. Obwohl in diese langfristige Untersuchung die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag einging, ist erkennbar, daß auch bei direkt hintereinander erfolgten Bestimmungen starke Streuungen auftraten. Auffällig sind die wesentlich höheren Peakströme, die mit der MFE in der Wall-Jet Zelle gegenüber der EFTA erzielt wurden. Der Durchmesser der beiden verwendeten Glaskohle-Elektroden betrug 3 mm. Die Funktionsfähigkeit des Quecksilberfilms konnte sehr einfach bestimmt werden. Ein starker Anstieg des Grundstromes gegenüber vorherigen Chromatogrammen wies auf eine mindestens teilweise Zerstörung des Quecksilberfilms hin. Die Ergebnisse zeigen, daß der Film stabil gegenüber Flußänderungen im Bereich 0 bis 0,7 mL/min war. In der Meßserie, die mit der Wall-Jet Zelle durchgeführt worden war, ist der erste Meßwert signifikant gegenüber den folgenden Meßwerten erhöht. Diese Beobachtung wurde anhand weiterer Messungen mit der MFE in der Wall-Jet Zelle bestätigt.

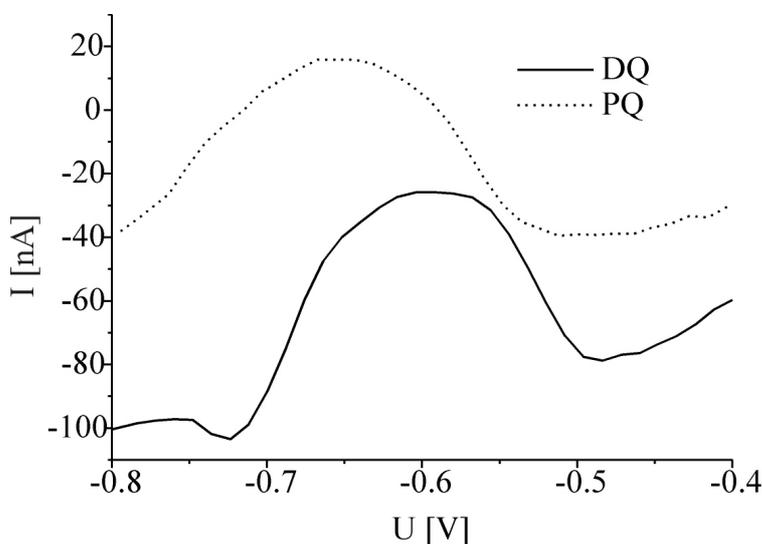


Abb. 4.19: Untergrundkorrigierte Differenzpuls Voltammogramme (MFE in der Wall-Jet Zelle, $c = 10 \mu\text{g/mL}$). Entnommen beim Peakmaximum des Chromatogrammes aus der Datenmatrix eines HPLC-HDVD Chromatogrammes.

Ein Blick auf das zweidimensionale Chromatogramm (Abb. 4.18) zeigt, daß die Abtastrate bezüglich der Retentionszeit (hier proportional zur Scan-Nummer) mit ca. 11 Punkten für DQ und PQ sehr gering ist. Die Nachweisgrenze für DQ und PQ wurde für die Detektion an der MFE in der Wall-Jet Zelle mit Differenzpuls Voltammetrie abgeschätzt durch die Bestimmung des dreifachen Signal zu Rauschverhältnisses. Dieser Nachweisgrenze liegt die Amplitude des Grundrauschens zugrunde, in Abgrenzung zur Bestimmung der Nachweisgrenze über die dreifache Standardabweichung. Hierzu wurde ein Standard mit geringer Analytkonzentration injiziert und die Höhe des Grundlinienrauschens vor und nach Elution des Analyten bestimmt. Die Peakhöhe wurde bestimmt und so auf die Konzentration zurückgeschlossen, die dem Signal zu Rauschverhältnis drei entsprach. Für DQ und PQ wurde so eine Nachweisgrenze von 5 µg/mL entsprechend einer Masse von je 100 ng ermittelt. Da die Analysenmethode für die quaternären Ammoniumverbindungen mit HPLC-HDVD für die Spurenanalytik zu wenig nachweisstark war, wurde zunächst auf eine Aufnahme von Kalibrationsdaten verzichtet.

Abbildung 4.19 zeigt die Differenzpuls Voltammogramme, die aus der Datenmatrix eines Chromatogrammes gewonnen wurden. Wie zuvor bei der Bestimmung im Batch (Kapitel 4.1) reichte die Trennung der Peakpotentiale nicht aus; $\Delta E_{1/2}$ betrug 50 mV, die Summe der Peakweiten auf Höhe der Wendepunkte (ΣU_{width}) 350 mV, damit nimmt $\Delta E_{1/2}$ einen Wert von 14 % von ΣU_{width} ein [115]. Das Signal von PQ wurde nicht vollständig in dem hier gewählten Potentialfenster erfaßt.

Amperometrie an Quecksilberelektroden in den verschiedenen Detektorzellen

Die Amperometrie sollte als weitere elektrochemische Detektionsmethode getestet werden, um Vergleichsdaten zu der Arbeit von Ternes zu gewinnen [2]. Es wurden Messungen

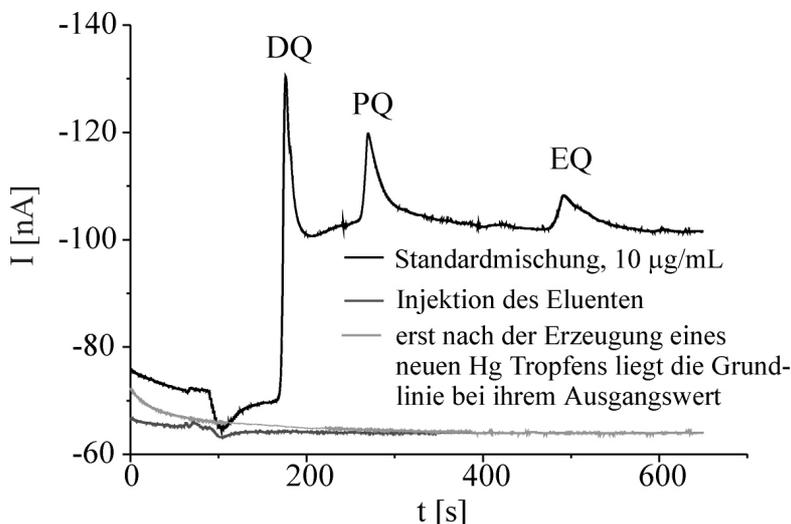


Abb. 4.20: Chromatogramm einer Mischung der Vergleichssubstanzen ($c = 10 \mu\text{g/mL}$) mit fehlerhafter Peakform bei amperometrischer Detektion (-800 mV) an der HMDE in der W-Kanal EFTA. Zum Vergleich ein Chromatogramm des injizierten Eluenten, der Grundlinienversatz baut sich erst ab, wenn eine neue HMDE erzeugt wird.

durchgeführt mit der HMDE in der herkömmlichen EFTA und der W-Kanal EFTA, sowie mit der MFE in der Wall-Jet Zelle. Als Arbeitspotential wurde -1 V angelegt. Hierbei traten bei der EFTA anormale Peakformen auf (Abb. 4.20). Die Basislinie erreichte nach der Elution von DQ nicht mehr ihr ursprüngliches Niveau und konnte erst nach Erzeugung einer neuen HMDE wieder auf den Ausgangswert zurückgebracht werden. Auf diesem Untergrund konnten die nachfolgenden Analyten kaum noch nachgewiesen werden. Über das Auftreten des fehlerhaften chromatographischen Verhaltens in der Amperometrie lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen:

1. Der anormale Grundlinienverlauf nach der Elution von DQ trat im Betrieb der Detektorzellen vom EFTA-Typ mit scannender Voltammetrie nicht auf.
2. Auch die amperometrische Detektion in der Wall-Jet Zelle an der MFE zeigte die üblichen Peakformen.
3. Diese Störung wurde bei der herkömmlichen und der W-Kanal EFTA beobachtet. Eine Verzerrung des Peaks durch Totvolumina in der Apparatur konnte als Erklärung ausgeschlossen werden, da der in Reihe geschaltete UV Detektor einwandfreie Peakformen zeigte.
4. Es gelang einmal, die EFTA mit herkömmlicher Kanalplatte und nicht silanisierter Kapillare so einzusetzen, daß die amperometrischen Chromatogramme einen einwandfreien Grundlinienverlauf aufwiesen. Obwohl die Messtechnik und die Methodik jederzeit nachvollziehbar sein muß, wurde die Situation sofort genutzt, um Messungen für die Reproduzierbarkeiten und Nachweisgrenzen der amperometrischen Detektion an der HMDE in der EFTA zu ermitteln. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 4.1.5 vorgestellt.

4.1.5 Optimierung der Steuereinheit für HPLC-HDVD

DC-Voltammetrie mit dem VA Prozessor 693

Neben der Differenzpuls Voltammetrie wurde die DC-Voltammetrie mit dem VA Prozessor 693 als Steuereinheit hinsichtlich der Anwendbarkeit für HPLC-HDVD geprüft. Zur Initiierung der Spannungsrampen stellt das Messgerät zwei Modi zur Verfügung: "DCTmode" und "CYCmode", beide generieren Treppenstufen Rampen, die über die Stufenweite (t_{step}) und die Stufenhöhe (U_{step}) definiert werden. Im "CYCmode" können Cyclovoltammogramme aufgenommen werden und Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten bis zu 99 V/s erreicht werden, während im "DCTmode" die Richtung des Spannungsvorschubs nicht umgekehrt werden kann und die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit auf maximal 240 mV/s limitiert ist. Beide Modi werden unterschiedlich in die Programmstruktur eingebunden.

Die Detektion der quaternären Ammoniumverbindungen mit DC-Voltammetrie wurde an der MFE in der Wall-Jet Zelle im "CYCmode" getestet, hierzu wurde ein Potentialfenster von -200 mV bis -800 mV mit einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 500 mV/s abgefahren.

Abbildung 4.21 zeigt ein Chromatogramm der quaternären Ammoniumverbindung PQ in unterschiedlichen Konzentrationen. Offensichtlich lag ein Meßfehler vor, da die Signale in keinem Zusammenhang mit den chromatographischen Ereignissen standen. Auffällig waren die sehr hohen Ströme von bis zu 12 μA . Eine Untersuchung der Abbildung ergab, daß genau 9 Datenpunkte, entsprechend 9 Spannungsrampen, innerhalb eines starken Anstiegs des

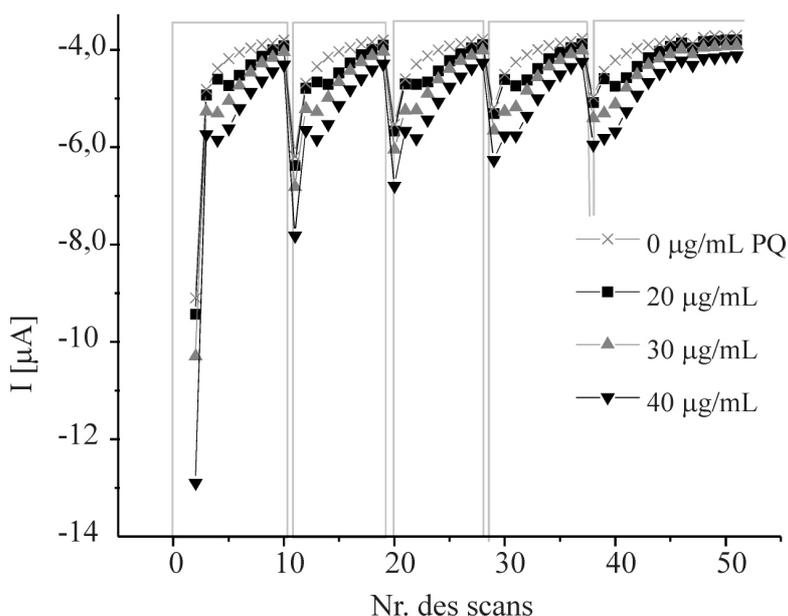


Abb. 4.21: On line Messungen mit DC Voltammetrie mit dem VA Prozessor 396, verschiedene Konzentrationen wurden bestimmt. Es werden die gemessenen Ströme bei -800 mV angezeigt. Die grauen Umrandungen bezeichnen die Scans, die innerhalb eines Programmblocks abgearbeitet wurden

gemessenen Stromes lagen. Bei der zehnten Messung brach der Strom ein. Ursache dafür war, daß das Meßgerät die Arbeitsspannung bei direkt aufeinander folgenden Spannungsrampen aufrecht hielt. Sprang das Programm in ein anderes Segment, setzte der Potentiostat die Spannung kurzfristig auf 0 V, dadurch stieg der Strom stark. Diese durch die Steuerung des Potentiostaten verursachten kapazitiven Ladeströme, die alle Analytsignale überdecken, ließen sich nicht umgehen. Der Modus "CYCmode" war demnach nicht für die online HPLC-Detektion geeignet.

Ferner wurde die DC-Voltammetrie im "DCTmode" mit der oben angewendeten Detektor-konfiguration getestet. Dieser Modus ließ sich in die Programmstruktur einbinden wie auch die Differenzpuls Technik, die quaternären Ammoniumverbindungen waren damit detektierbar. Der "DCTmode" unterlag genau den selben Restriktionen bezüglich der Spannungsvorschubgeschwindigkeit, wie die differentiellen Meßtechniken, die der VA Prozessor bereitstellt.

µAutolab als Kontrolleinheit für HPLC-HDVD

Bei den bisherigen Versuchen mit dem VA Prozessor als Potentiostaten traten grundsätzliche Schwierigkeiten auf, die voltammetrische Messung an die Erfordernisse der Durchflußanalytik anzupassen. Diese Limitation durch das Meßgerät sollte durch den Einsatz eines anderen Potentiostaten umgangen werden. Das µLab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande) ist ein Potentiostat, der die Anwendung der Messmethoden DC und Cyclovoltammetrie, sowie die differentiellen Meßtechniken Differenzpuls und Rechteck Voltammetrie ermöglicht. Die Wiederholung von Spannungsrampen wurden über den Eintrag der Zahl der Rampen in die Parameterliste der Steuerungssoftware reguliert. Hier war also keine komplizierte Blockstruktur notwendig, um das Scannen zu automatisieren. Auch hier war die Zahl der maximal aufnehmbaren Datenpunkte begrenzt. Um die Meßzeit trotzdem ausdehnen zu können, ergaben sich für die on-line scannende Voltammetrie drei Perspektiven:

- I. Verwendung der Steuerungssoftware "General purpose electrochemical system (GPES), Version 3.4" unter DOS. Es wurde hierfür eine elektrochemische Methode mit der Steuerungssoftware programmiert, die die elektrochemischen Parameter enthielt (Methode: DCV, DPV, SQWV; U_{start} , U_{stop} als Start- und Stopspannung einer Spannungsrampe, U_{step} , t_{step} als Dauer einer Spannungsstufe, U_{puls} , t_{puls} , t_{mess} , Zahl der Scans, Empfindlichkeitsbereich der Strommessung, Konditionierungspotential, die Zeit zur Gleichgewichtseinstellung (t_{eq}) und andere). Die Zahl der Rampen betrug immer eins. Diese mit GPES 3 erstellte Methode wurde von einem DOS Stapel-Programm aufgerufen, gestartet und die Messwerte eines jeden scans in eine eigene Datei im ASCII -Format gespeichert. Der Inhalt dieser über 100 Dateien wurde mittels eines eigens hierfür

erstellten Visual Basic Programms eingelesen und zu einer einzigen Datenmatrix vereinigt. Jeder Meßwert war einer Spannung und einer Scan-Nummer zugeordnet. Diese Datenmatrix wurde mit bereits vorgestellten Methoden ausgewertet.

- II. Verwendung der Steuerungssoftware "General purpose electrochemical system (GPES), Version 4.4" unter Windows 3.1 (eine Version für 32 bit Betriebssysteme ist noch nicht erhältlich). Mit dieser Software können zwar in allen voltammetrischen Messtechniken mehrere Rampen hintereinander ausgeführt werden, jedoch können nur im DC Modus alle vollzogenen Rampen auch gespeichert werden. Die Ströme sind in einer Datenmatrix im ASCII-Format zugänglich für Auswertungen. Bei den differentiellen Meßtechniken wird der Mittelwert der Ströme der gleichen Spannung über alle ausgeführten Scans gemittelt. Also mußte für die automatische sequentielle Ausführung der Scans differentieller Meßtechniken auf die Makroskript-Sprache, die von der Software geboten wird, zurückgegriffen werden. Hierfür wurde eine Messmethode eingerichtet, die die Messung einer Rampe steuerte. Mit dem Makro wurde diese Methode gestartet und die erhaltenen Daten in eine einzige Datei gespeichert. Der Inhalt der Dateien konnte mit dem oben vorgestellten Visual Basic Programm zusammengefaßt werden.
- III. Verwendung der Steuerungssoftware wie unter Punkt II. Diese Software bietet neben den elektrochemisch analytischen Methoden, die für Batch-Messungen vorgesehen sind, ein Modus für Messungen im Fluß, der sich Multipuls Voltammetrie (MPV) nennt. Bei dieser Meßtechnik werden vom Potentiostaten wahlweise bis zu 10 Spannungsniveaus angesteuert, somit ist MPV der DC Voltammetrie am ähnlichsten. Die Daten sind als Matrix im ASCII-Format zugänglich.

Alle drei vorgestellten Möglichkeiten wurden hinsichtlich ihrer Eignung für die on-line scannende Voltammetrie geprüft. Die Variante unter I. erwies sich als praktikabel, die Unterbrechungen der Messungen für die Datenspeicherungen waren sehr kurz (< 1 s). Die unter II. vorgeschlagene Methode unter Verwendung der Makroskript-Sprache erwies sich als nicht praktikabel, da die Zeit, in der der Rechner mit dem Speichern der Daten ausgelastet war, mit ca. 4 s pro Scan zu groß war. Die online scannende DC Voltammetrie mit der Software GPES 4.4 konnte z. B. mit $U_{\text{step}} = 10$ mV, einem Potentialfenster von einem Volt, einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 0,5 V/s und 1 s Gleichgewichtseinstellung 120 Scans ausführen, was einer Meßdauer von 360 s entsprach. Diese Methode konnte für noch folgende Versuche zur Optimierung der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit und der Tropfengröße der HMDE eingesetzt werden. Die Variante III. erwies sich als gut ausführbar, und die Daten waren schnell zugänglich für die Auswertung.

Einfluß der Tropfengröße auf die Reproduzierbarkeiten und Nachweisgrenzen

Im Folgenden wurden die Auswirkung der Tropfengröße der HMDE auf die chromatographischen Peakhöhen, die Wiederholbarkeiten und die Nachweisgrenzen in der Bestimmung von DQ, PQ und EQ mit HPLC-HDVD und HPLC-Amperometrie ermittelt.

Folgende Gerätekonfiguration wurde für die hier vorgestellten Ergebnisse eingesetzt: Die chromatographische Methode entsprach der in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Chromatographie mit Kieselsäule. Als Potentiostat wurde ein μ Lab (Eco Chemie, Utrecht) eingesetzt und die Detektorzelle wurde in den VA Stand 694 eingesetzt. Für die Versuche unter Variation der Tropfengröße wurde die Multimode Elektrode zur Generierung der HMDE über den VA Prozessor 693 angesteuert. (Dieser instrumentelle Aufwand ist nicht unbedingt erforderlich, da für das μ Autolab eine Steuerungseinheit für die Multimode Elektrode erhältlich ist.)

Die Parameter für die elektrochemische Detektion wurden wie folgt eingestellt:

Technik = linear sweep voltammetry (DCV)

$$U_{start} = -0,5 \text{ V}$$

$$t_{eq} = 1 \text{ s}$$

$$U_{stop} = -1,0 \text{ V}$$

$$U_{step} = 6 \text{ mV}$$

$$dU/dt = 0,5 \text{ V/s}$$

cell not off after measurement

Von den möglichen Tropfengrößen von 1 bis 9, entsprechend den Oberflächen 0,15 bis 0,60 mm², wurden die Größen 1, 5 und 9 eingestellt und ein Multistandard mit der Konzentration 10 mg/mL mit je 10 Wiederholungen bestimmt. Die Chromatogramme wurden bei -800 mV

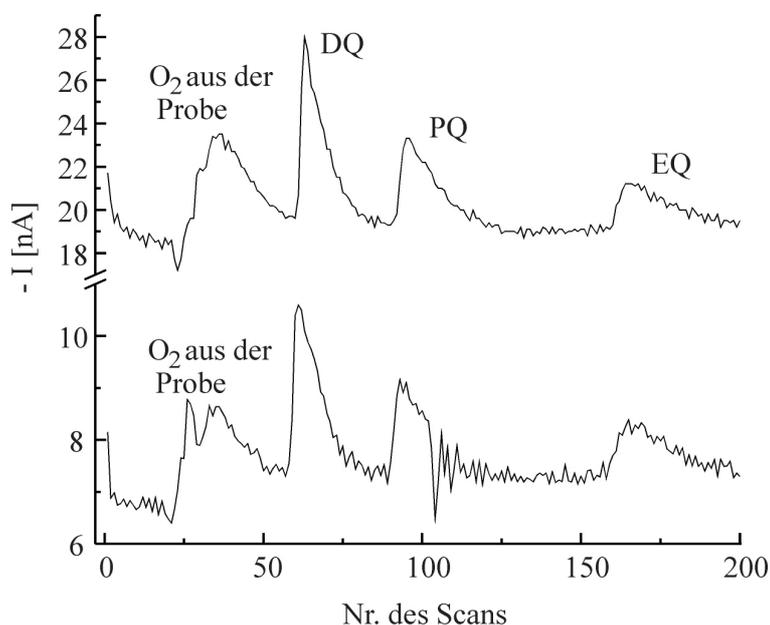


Abb. 4.22: Beispiel-Chromatogramme eines Multistandards (10 μ g/mL) unter identischen Bedingungen mit HPLC-HDVD, hier DC Voltammetrie, HMDE Größe 5, $U = -800 \text{ mV}$

ausgewertet, dort erreichten alle Analyten den Diffusionsgrenzstrom. Die Nachweisgrenzen wurden über das dreifache Signal zu Rausch Verhältnis ermittelt.

Tabelle 4.4: Mittlere Peakhöhen, Reproduzierbarkeiten (n = 10) und Nachweisgrenzen mit DC voltammetrischer Detektion in Abhängigkeit von der Tropfengröße der HMDE

Tropfengröße		1	5	9
	mittlere Peakhöhe [nA]	-3,19	-7,92	-11,2
DQ	sd [nA] (rsd [%])	0,35 (11)	0,37 (5)	2,04 (18)
	NWG [$\mu\text{g/mL}$]	1,9	1,6	0,4
	mittlere Peakhöhe [nA]	-1,72	-3,85	-5,37
PQ	sd [nA] (rsd [%])	0,17 (10)	0,30 (8)	0,64 (12)
	NWG [$\mu\text{g/mL}$]	1,7	1,9	2,0
	mittlere Peakhöhe [nA]	-0,91	-2,14	-2,78
EQ	sd [nA] (rsd [%])	0,08 (8)	0,31 (14)	0,70 (26)
	NWG [$\mu\text{g/mL}$]	2,0	2,1	1,94

Die hier erzielten Nachweisgrenzen bedeuten eine systematische Verbesserung gegenüber den Nachweisgrenzen von $5 \mu\text{g/mL}$, die mit on-line DPV Messungen an der Quecksilberfilm Elektrode gemessen worden waren. Abb. 4.22 zeigt zwei Chromatogramme der Meßserie. Auffällig sind hierbei die starken Oszillationen, die dort auftreten. Beide Chromatogramme wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen. Diese Schwingungen traten demnach unabhängig von dem chromatographischen Geschehen in der Meßzelle auf. Als mögliche Ursache kam eine unzureichende Abschirmung gegenüber elektrostatischer Aufladung in Frage. Das starke und temporär begrenzte Schwanken der Grundlinie ging in die Nachweisgrenze und die Wiederholbarkeit ein. Daraus sind die für zehn Parallelbestimmungen sehr hohen Standardabweichungen von bis zu 26 % zu erklären. Keine der Meßserien wies eine Standardabweichung kleiner 5 % auf. Die stark tailende Peakform war auf die bereits angesprochene Zersetzung des Kieselgels der Trennsäule zurückzuführen.

Die Peakhöhen zeigten einen eindeutigen Zusammenhang mit der Tropfengröße: Je größer der Tropfen, desto größer die Peakströme. Das Signal zu Rausch Verhältnis wurde von der Tropfengröße jedoch nicht beeinträchtigt, ebensowenig wie die Reproduzierbarkeit.

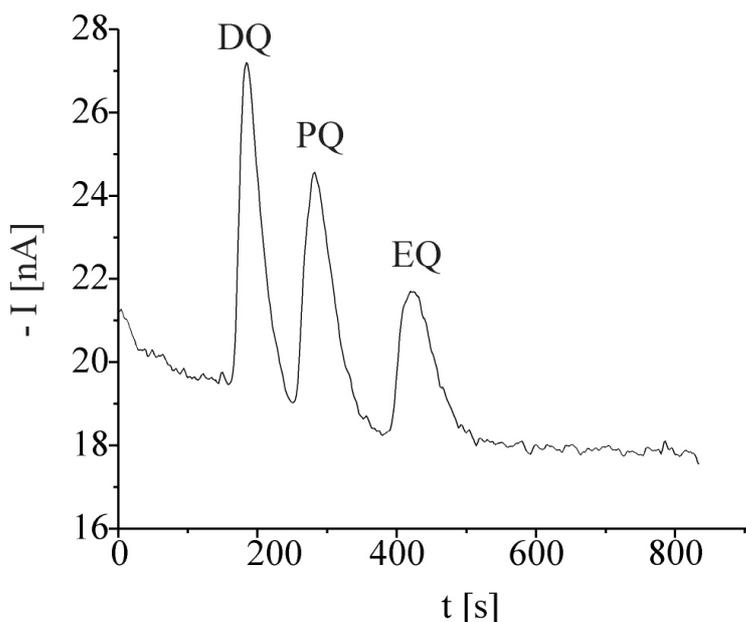


Abb. 4.23: Chromatogramm eines Multistandards (10 $\mu\text{g/mL}$) mit HPLC-Amperometrie, HMDE GröÙe 5, $U = -800 \text{ mV}$, EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur

In Kapitel 4.1.4 werden die Schwierigkeiten bei der amperometrischen Detektion an der HMDE in den Detektorzellen vom Typ EFTA beschrieben. Ein Vergleich der analytischen KenngröÙen scannender und amperometrischer Detektion, sowie ein Vergleich der amperometrischen Detektion an der HMDE mit Literaturdaten [2] ist jedoch notwendig. Es gelang einmal, wahrscheinlich durch einen zufällig optimalen Zusammenbau der Detektorzelle mit herkömmlicher Kanalplatte und nicht silanisierten Glaskapillaren, die drei quaternären Ammoniumverbindungen DQ, PQ und EQ amperometrisch einwandfrei zu detektieren (Abb. 4.23). Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.5 vorgestellt.

Tabelle 4.5: Peakhöhen (I), Standardabweichungen (sd , rsd) und Nachweisgrenzen (NWG) von DQ, PQ und EQ mit amperometrischer Detektion an der HMDE in der EFTA bei -800 mV unter Variation der TropfengröÙe; ($n = 8$)

TropfengröÙe	1	5	9
- I [nA]	2,24	5,27	9,15
DQ sd [nA] (rsd [%])	0,09 (4)	0,67 (13)	0,78 (9)
NWG [$\mu\text{g/mL}$]	0,3	0,6	0,3
- I [nA]	1,33	1,92	5,92
PQ sd [nA] (rsd [%])	0,16 (12)	0,20 (11)	0,74 (13)
NWG [$\mu\text{g/mL}$]	0,8	1,0	0,4
- I [nA]	0,84	1,42	3,78
EQ sd [nA] (rsd [%])	0,05 (6)	0,12 (8)	0,74 (20)
NWG [$\mu\text{g/mL}$]	1,5	1,1	0,5

Bei maximaler Tropfengröße wurden die maximalen chromatographischen Peakhöhen erzielt. Die Standardabweichungen durchlaufen für DQ und PQ bei mittlerer Tropfengröße ein Maximum. Die Nachweisgrenzen waren für alle Analyten bei der Größe 9 minimal. Wie bei allen Wiederholungsmessungen, die durchgeführt worden sind, waren die Standardabweichungen sehr hoch. Die Nachweisgrenzen lagen niedriger als bei der scannenden Voltammetrie, Tabelle 4.4.

Einfluß der Spannungsvorschubgeschwindigkeit (dU/dt) und der Stufenhöhe (U_{step}) auf die Reproduzierbarkeiten und Nachweisgrenzen

Eine weitere Untersuchung zielte auf die Optimierung der Wiederholbarkeiten durch eine angepaßte Spannungsvorschubgeschwindigkeit ab. Hierbei können sich zwei Effekte überlagern: Eine hohe Spannungsvorschubgeschwindigkeit ermöglicht eine hohe Abtastrate bezüglich der Retentionszeit, so daß ein chromatographischer Peak durch hinreichend viele Datenpunkte beschrieben wird. Es wird erwartet, daß durch die Erhöhung von dU/dt die Reproduzierbarkeit verbessert werden kann. Dem entgegengesetzt ermöglicht eine niedrige Spannungsvorschubgeschwindigkeit eine lange Messung auf jeder Spannungsstufe. Da der Potentiostat, gesteuert über den Parameter α , am Ende einer jeden Stufe mißt, wenn der kapazitive Ladestrom weitestgehend abgeklungen ist, ist bei langen Stufen (gleichbedeutend mit niedrigen Spannungsvorschubgeschwindigkeiten) das Verhältnis von Faradayschem zu kapazitiven Ladestrom am günstigsten. α nimmt Werte zwischen 0,25 (die Messung erfolgt bei einem Viertel der Stufenlänge) und 1 (die Messung erfolgt am Ende der Stufe) ein. Die beiden letztgenannten Faktoren sollten geringe Spannungsvorschubgeschwindigkeiten begünstigen. Als weiterer, konfigurierbarer Parameter steht beim μ Autolab die Stufenhöhe U_{step} zur Verfügung, die im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der Meßpunkte pro Voltammogramm steht. Hier gilt es einen Kompromiß zu finden zwischen möglichst hoher Abtastrate und der Anzahl ausführbarer Spannungssweeps.

Für die Messungen unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit wurde die Wall-Jet Zelle eingesetzt. Auf die Glaskohle-Elektrode wurde nach dem in Kapitel 4.1.4 präsentierten Verfahren ein Quecksilberfilm aufgebracht. Auch hier wurde die DC Voltammetrie als elektrochemische Methode für die hydrodynamische Detektion nach der HPLC eingesetzt. Es wurden je fünf Wiederholungsmessungen durchgeführt und die Spannungsvorschubgeschwindigkeiten 0,5 V/s, 1 V/s und 2 V/s eingestellt. U_{step} wurde als der Parameter variiert. Hier wurden für alle Spannungsvorschubgeschwindigkeiten (dU/dt) die Stufenhöhen 2,1 mV, 6,0 mV und 12 mV eingestellt. Das Startpotential lag bei 0 V und das Stoppotential bei - 1 V. Es wurde eine minimal wählbare Zeit zur Equilibrierung der Elektrode vor der Ausführung eines jeden Scans von 1 s und das Potential in dieser Zeit auf 0 V eingestellt.

Für das gegebene Potentialfenster ergab sich die maximale Anzahl speicherbarer Scans von 62 ($U_{\text{step}} = 2,1 \text{ mV}$), 179 ($U_{\text{step}} = 6 \text{ mV}$) und 359 ($U_{\text{step}} = 12 \text{ mV}$). Die Meßprogramme dauerten dann minimal 93 Sekunden bei 62 Scans und 2 V/s und maximal 1077 Sekunden bei 359 Scans und 0,5 V/s. Bei der sehr kurzen Dauer eines Meßprogrammes von 93 Sekunden traten dann Schwierigkeiten auf, die chromatographischen Peaks vollständig zu erfassen. Diese Ungenauigkeiten gingen in die hier ermittelten Standardabweichungen ein.

Tabelle 4.6: Mittlere Peakhöhen (I), Standardabweichungen (sd) und relative Standardabweichungen (rsd) unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeiten (dU/dt) und der Stufenhöhe (U_{step}); ($n=5$)

U_{step} [mV]		DQ			PQ			EQ		
		2,1	6,0	12	2,1	6,0	12	2,1	6,0	12
0,5 V/s	- I [μA]	1,52	1,17	0,67	0,83	0,59	0,42	0,45	0,35	0,19
	sd [μA]	0,23	0,57	0,1	0,07	0,19	0,03	0,04	0,89	0,01
	(rsd [%])	(15)	(49)	(15)	(8)	(33)	(8)	(9)	(25)	(7)
1,0 V/s	- I [μA]	1,41	0,84	0,58	0,85	0,67	0,46	0,53	0,41	0,21
	sd [μA]	0,59	0,09	0,09	0,48	0,07	0,02	0,28	0,03	0,01
	(rsd [%])	(42)	(11)	(16)	(56)	(11)	(4)	(52)	(8)	(5)
2,0 V/s	- I [μA]	1,69	0,87	0,72	0,60	1,11	0,60	0,64	0,44	0,27
	sd [μA]	0,64	0,08	0,08	0,26	0,09	0,02	0,40	0,04	0,01
	(rsd [%])	(38)	(9)	(11)	(44)	(8)	(3)	(62)	(10)	(5)

Um die Meßergebnisse zu veranschaulichen, werden die Peakhöhen und relativen Standardabweichungen exemplarisch für DQ in Abbildung 4.24 dargestellt. Für die Peakhöhen ergab sich die größte Abhängigkeit von dem Parameter U_{step} . Bei der kleinsten Stufenhöhe ergaben sich fast ausnahmslos für alle Analyten und Spannungsvorschubgeschwindigkeiten die größten Peakströme und für die Stufenhöhe 12 mV ergaben sich die kleinsten Peakströme. Der Einfluß der Spannungsvorschubgeschwindigkeiten auf die Peakströme war gering, hier konnte allenfalls eine leicht steigende Tendenz mit wachsender Spannungsvorschubgeschwindigkeit ausgemacht werden.

Die Standardabweichungen sind für alle Chromatogramme sehr hoch. Besonders wenn man die Anzahl von fünf Wiederholungen berücksichtigt, erscheinen diese Ergebnisse als sehr ungünstig, da die Standardabweichung proportional zu $1/\sqrt{n}$ ist [114]. Bei der kleinen Stufenhöhe von 2,1 mV stieg die Standardabweichung mit wachsender Spannungsvorschubgeschwindigkeit, was auf die kurze Dauer des Meßprogrammes zurückzuführen war und den

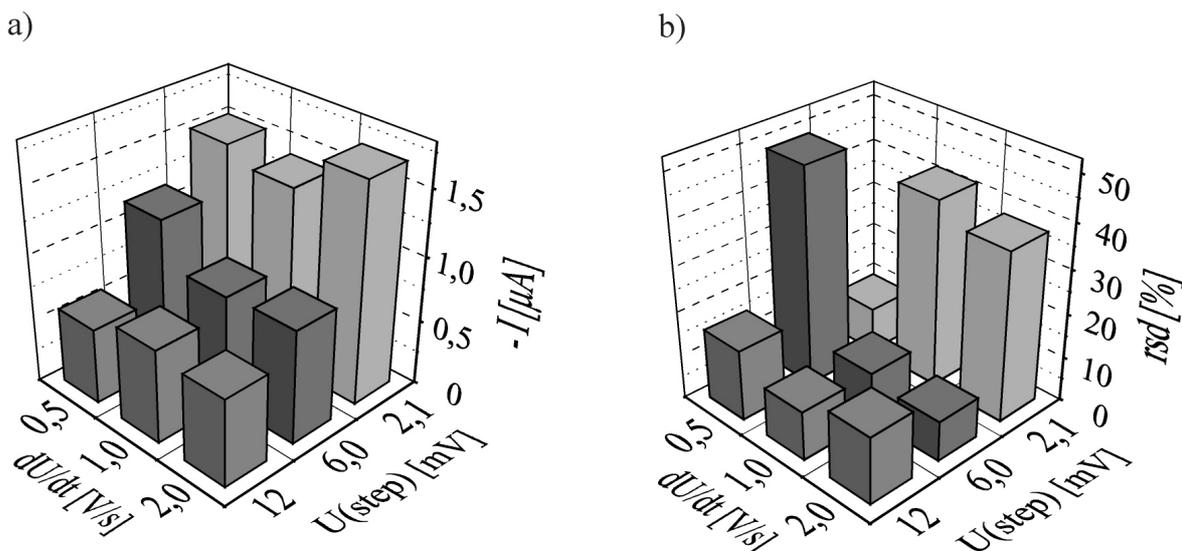


Abb. 4.24.a: Chromatographische Peakhöhen mit HPLC-HDVD (DC Voltammetrie) an der MFE in der Wall-Jet Zelle unter Variation der Stufenhöhe (U_{step}) und der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit (dU/dt), hier exemplarisch für DQ

Abb. 4.24.b: Relative Standardabweichungen (rsd) der in Abb. 4.24.a dargestellten Versuchsserie

damit verbundenen Schwierigkeiten, die chromatographischen Peaks immer voll zu erfassen. In Abbildung 4.24.b fällt die Abweichung der relativen Standardabweichung bei $dU/dt = 0,5$ V/s und $U_{\text{step}} = 6,0$ mV nach oben und bei $dU/dt = 0,5$ V/s und $U_{\text{step}} = 2,1$ mV nach unten auf. Der Vergleich der Standardabweichungen mit dem Bartlett-Test (Doerffel, S. 114 [114]) zeigte eine signifikante Abweichung dieser auffälligen Werte von den anderen Standardabweichungen bei gleicher U_{step} (Signifikanzniveau = 95 %). Es sei darauf hingewiesen, daß die mit Abbildung 4.22 aufgezeigte Störung die Abweichung nach oben erklärt. Bei allen anderen Versuchen wirkte sich die erhöhte Spannungsvorschubsgeschwindigkeit erniedrigend auf die Streuung aus, wenn auch nur im geringen Maße. Dieser geringe Einfluß ließ sich bereits rein rechnerisch nachvollziehen: Die Zeit für die Gleichgewichtseinstellung der Elektrode (t_{eq}) vor jedem Scan nahm bereits bei einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 0,5 V/s und einem Potentialfenster von einem Volt 33 % der Gesamtdauer einer Wiederholung ein. Je größer die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit wurde, desto geringer wurde ihr Einfluß auf die Gesamtdauer, selbst bei größter Geschwindigkeit konnte eine Sekunde nicht untertroffen werden. Demzufolge war die Auswirkung der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit auf Anzahl der Datenpunkte, die einen Peak im zweidimensionalen Chromatogramm beschrieben, entsprechend klein. Es ist hier zu erwarten, daß die negativen Auswirkungen, die mit hoher Spannungsvorschubsgeschwindigkeit verbunden sind, überwogen.

Tabelle 4.7: Mittlere Anzahl der Datenpunkte über einen chromatographischen Peak

	DQ	PQ	EQ
0,5 V/s	12	17	24
1,0 V/s	15	22	29
2,0 V/s	19	24	81

Die Zeit zur Gleichgewichtseinstellung erwies sich in der on-line scannenden DC Voltammetrie als unbedingt erforderlich. Strommessungen ohne Equilibrierungszeit waren unmöglich, da der dann resultierende Strom sämtliche Meßbereiche überschritt. Der kapazitive Ladestrom mußte in der Equilibrierungszeit abgefangen werden.

4.1.6 Analyse der Herbizide in Realproben mit HPLC-HDVD

Aus den vorangegangenen Kapiteln gehen die instrumentellen Konfigurationen und elektrochemischen Parameter hervor, die hier in optimierten Methoden angewendet werden sollten, um mit Festphasenextraktion (SPE) aufgearbeitete Gewässerproben zu analysieren. Als Vergleich dienen die in Kapitel 4.1.2 präsentierten Meßergebnisse der gleichen Proben mit HPLC-UVD. Auch hier wurden die chromatographischen Peaks über die Peakhöhen ausgewertet.

Die chromatographische Trennung mittels Kieselgelsäule und wässrigem Eluenten (Kap. 4.1.2) ging der elektrochemischen Detektion voraus. Als Detektorzellen wurden die W-Kanal EFTA, ausgestattet mit silanisierter Glaskapillare oder alternativ die Wall-Jet Zelle mit Quecksilberfilmelektrode eingesetzt. Zu dem Zeitpunkt, an dem das Meßprogramm in ein negativeres Potentialfenster wechselte, wurde für die Detektion von DF ein neuer Quecksilbertropfen hergestellt. Die Detektorzelle wurden mit dem μ Autolab (Eco Chemie, Utrecht) angesteuert und die Meßsignale wurden von demselben Potentiostaten aufgenommen und auf den PC übertragen. Die Multimode-Elektrode zur Erzeugung der HMDE wurde über den VA Stand 694 und den VA Prozessor 693 gesteuert, es wurde die Tropfengröße 5 eingestellt.

Es wurden drei elektrochemische Meßverfahren zur on-line Kopplung mit der HPLC angewendet:

- Differenzpuls Voltammetrie (DPV)
- Multipuls (MP)
- Amperometrie

Für DPV wurden folgende Parameter eingestellt: $U_{\text{start}} = 0 \text{ V}$; $U_{\text{stop}} = -1 \text{ V}$; $U_{\text{step}} = 30 \text{ mV}$ für DQ, PQ und EQ, $U_{\text{start}} = -1,0 \text{ V}$; $U_{\text{stop}} = -1,8 \text{ V}$; $U_{\text{step}} = 25 \text{ mV}$ für DF. Die zulässigen Meßbereiche wurden für DQ, PQ und EQ auf 100 nA gesetzt und für DF von 100 nA bis $10 \mu\text{A}$. Weitere Parameter waren $t_{\text{puls}} = 0,07 \text{ s}$ und $t_{\text{interval}} = 0,1 \text{ s}$ als maßgeblicher Wert für die Meßpunktdichte; $U_{\text{puls}} = -30 \text{ mV}$; $t_{\text{eq}} = 0 \text{ s}$; $t_{\text{conditioning}} = 0 \text{ s}$. Die Ausführung, Messung und Wiederholungen wurden mit der Software GPES 3.4 gesteuert und die Daten wurden mit der in Kapitel 4.1.5 vorgestellten Methode verwaltet.

Für die Amperometrie betrug das Detektionspotential $-0,8 \text{ V}$ und $t_{\text{interval}} = 0,1 \text{ s}$.

In der MP Detektion wurde die kürzeste wählbare Intervallzeit (t_{interval}) mit $0,1 \text{ s}$ eingestellt. Die Spannungsmodulation wurde weiterhin durch die Zahl und Lage der Spannungsstufen definiert, wobei hier für DQ, PQ und EQ zehn equidistante Potentiale zwischen $-0,4 \text{ V}$ und

-0,82 V und für DF neun equidistante Potentiale zwischen -1,25 V und -1,65 V gewählt wurden.

Tabelle 4.8 zeigt die damit gewonnenen Kalibrationsdaten. Die Abbildungen der Kalibrationsgeraden befinden sich im Anhang 7.4.

Tabelle 4.8: Kalibrationsdaten (Empfindlichkeiten, Linearitätsbereiche, Nachweisgrenzen (NWG) und Standardabweichungen) für vier quaternäre Ammoniumverbindungen mit vier unterschiedlichen Detektionsmethoden

		MP/HMDE	DPV/ HMDE	MP/MFE	Amperometrie / MFE
DQ	Empfindlichkeit [$\text{nA}/\mu\text{g mL}^{-1}$]	2,646	0,03	7,861	6,457
	Linearität [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 - 20	2,5 - 30	5 - 50	5 - 40
	NWG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,4	2,4	1,8	2,1
	rsd [%]	2	4	11	15
PQ	Empfindlichkeit [$\text{nA}/\mu\text{g mL}^{-1}$]	0,697	0,018	5,5	3,41
	Linearität [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 - 30	2,5 - 30	5 - 50	5 - 40
	NWG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1,3	3,0	5,1	3,9
	rsd [%]	8	4	13	3
EQ	Empfindlichkeit [$\text{nA}/\mu\text{g mL}^{-1}$]	0,37	0,009	2,332	1,432
	Linearität [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 - 30	2,5 - 30	5 - 50	5 - 50
	NWG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1,1	2,7	2,6	7,5
	rsd [%]	10	1	8	17
DF	Empfindlichkeit [$\text{nA}/\mu\text{g mL}^{-1}$]	13,1	13,648		
	Linearität [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 - 20	2,5 - 30		
	NWG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,8	2,1		
	rsd [%]	4	9		

Die Nachweisgrenzen wurden hier über die Schnellschätzung mit der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 [113] bestimmt. Werte, die über ein dreifaches Signal zu Rausch Verhältnis bestimmt worden waren, zeigten eine gute Übereinstimmung [122]. Tatsächlich

waren die hier erzielten Nachweisgrenzen die niedrigsten, die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit mit scannender Voltammetrie erzielt werden konnten. Sie werden nur von der amperometrischen Detektion an der HMDE untertroffen. Die Linearitäten wurden in einem Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{g/mL}$ bis $30 \mu\text{g/mL}$ mit MP und DPV Detektion geprüft und bei der amperometrischen Detektion an der MFE im Bereich von $5 \mu\text{g/mL}$ bis $50 \mu\text{g/mL}$. Die Standardabweichungen wurden auf Basis einer dreifachen Bestimmung einer Mischung der Vergleichssubstanzen mit der Konzentration von je $10 \mu\text{g/mL}$ bestimmt. Auch die hier präsentierten Standardabweichungen waren die niedrigsten, die erzielt werden konnten. Diese liegen aber für ein analytisches Verfahren sehr hoch, besonders gemessen an den hohen Konzentrationen, die bestimmt worden waren. Abbildung 4.25 zeigt ein Chromatogramm mit allen Meßpunkten. Hier ist sehr deutlich zu erkennen, wie für DF ein anderes Potentialfenster gewählt wurde. Die Daten sind untergrundkorrigiert, indem ein Voltammogramm des Eluents von allen anderen Voltammogrammen abgezogen wurde. Die Halbstufenpotentiale, die mit der MPV Detektion an der HMDE in der W-Kanal EFTA bestimmt werden konnten, waren $-0,51 \text{ V}$ (DQ), $-0,6 \text{ V}$ (PQ und EQ), sowie $-1,41 \text{ V}$ (DF) vs. Ag/AgCl. Bei diesen

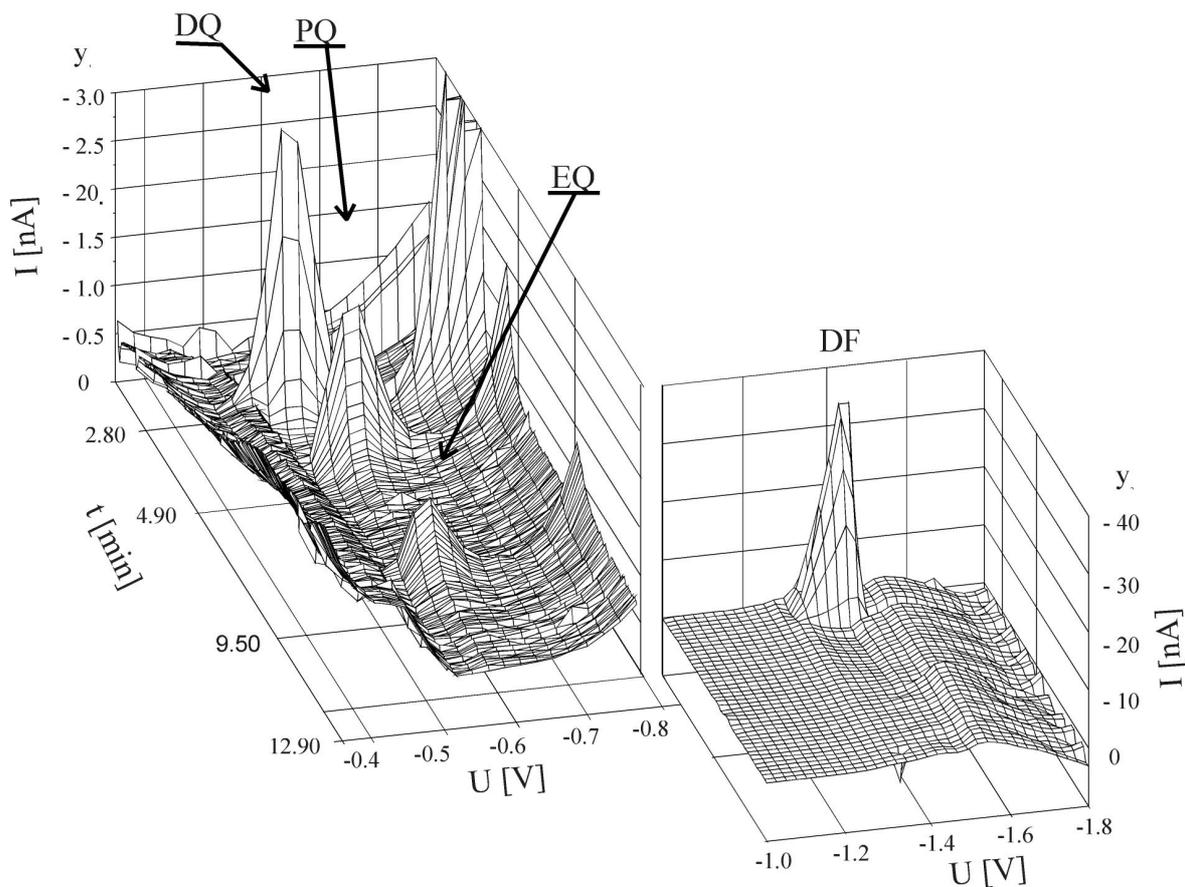


Abb. 4.25: Dreidimensionales HPLC-HDVD Chromatogramm von DQ, PQ, EQ und DF (alle $10 \mu\text{g/mL}$), hier mit Differenzpuls Voltammetrie an der HMDE in der W-Kanal EFTA, die Daten sind untergrundkorrigiert

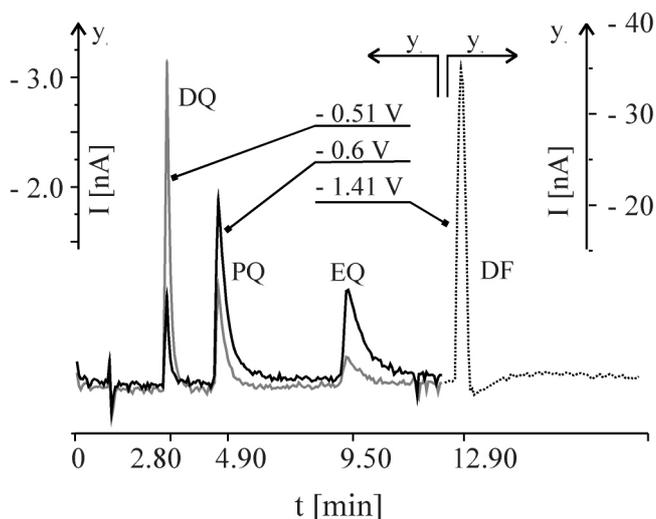


Abb. 4.26: Ausschnitt aus dem Chromatogramm aus Abbildung 4.25 - Darstellung als zweidimensionales Chromatogramm, die Ströme wurden bei $-0,51\text{ V}$; $-0,6\text{ V}$ und $-1,41\text{ V}$ entnommen

Spannungen wurden aus den Datenmatrizen die Stromwerte entnommen, um zweidimensionale Chromatogramme für die Quantifizierung zu erhalten (Abb. 4.26).

Die Multipulsdetektion lieferte Voltammogramme mit maximal 10 Meßpunkten (Abb. 4.27.a und b). Hier wird veranschaulicht, daß die qualitative Information größer war, als in

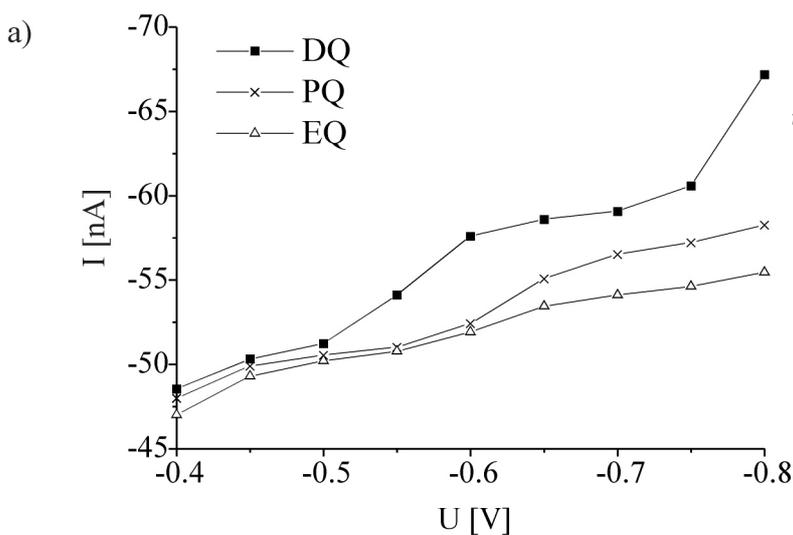


Abb. 4.27.a: Hydrodynamische Voltammogramme von DQ, PQ und EQ mit MP Detektion an der HMDE in der W-Kanal EFTA

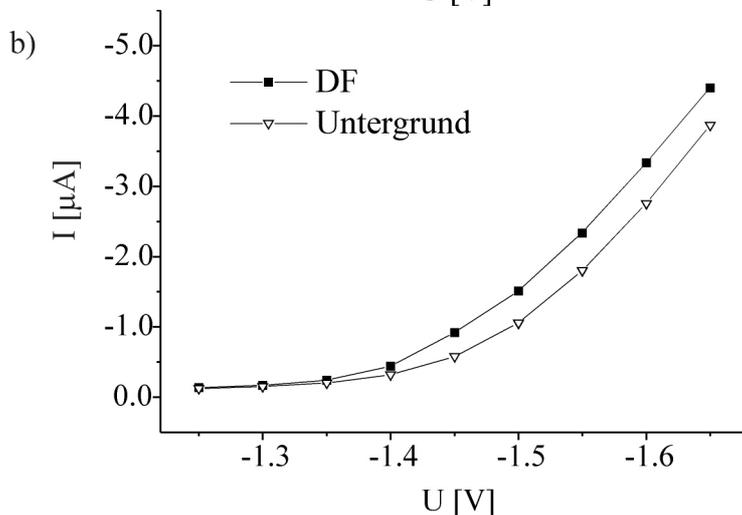


Abb. 4.27.b: Hydrodynamische Voltammogramme von DF und des Eluenten mit MP Detektion an der HMDE in der W-Kanal EFTA

der amperometrischen Detektion und daß eine eindeutige Zuordnung von Redoxstufen und Halbstufenpotentialen schwierig war. Aus den Voltammogrammen wurden die Halbstufenpotentiale $-0,55$ V (DQ) und $-0,62$ V (PQ, EQ) abgelesen. Ein Halbstufenpotential von DF läßt sich nicht ablesen, da der Untergrund, der in Kapitel 4.1.3 ausführlich untersucht worden war, im Verhältnis zum Analytsignal zu hoch war.

Analyse der Wasserproben

Die Wasserproben, die mit Festphasenextraktion auf Kieselgelbasis vorbereitet worden waren (Kap. 4.1.2), wurden mit HPLC-HDVD bestimmt. Es wurde Differenzpuls und Multipuls Voltammetrie an der HMDE in der W-Kanal EFTA als Detektionsmethode angewendet. Die Chromatogramme mit MP Detektion wurden über EQ als internen Standard korrigiert, da Kalibration und Probenmessungen in verschiedenen Wochen ausgeführt wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.8 präsentiert. Um die Beurteilung der Daten zu erleichtern, werden die bereits bekannten Analysenergebnisse mit HPLC-UVD hier mit eingebunden.

Tabelle 4.9: Wiederfindungsraten (WR) und Standardabweichungen (sd) der dotierten Wasserproben mit drei verschiedenen Detektionsmethoden (n = 12)

	WR [%] (sd [%])			
	DQ	PQ	EQ	DF
UV	42 (5)	83 (3)	103 (2)	82 (13)
MPV	35 (5)	82 (11)	100 (9)	84 (21)
DPV	44 (6)	92 (7)	105 (4)	87 (5)

Die Standardabweichungen wurden mit dem F-Test auf eine signifikante Übereinstimmung geprüft (Doerffel, S. 110 [114]). Die Standardabweichungen der DPV Detektion und UV Detektion von DQ stimmten auf einem Signifikanzniveau von 99 % überein. Außer für die Detektion von EQ mit Differenzpuls Voltammetrie und DF mit Multipuls Voltammetrie konnte keine Übereinstimmung der Zufallsfehler nachgewiesen werden.

Basierend auf den Standardabweichungen, Freiheitsgeraden und dem Vergleich zwischen den Standardabweichungen wurden die in der Tabelle 4.9 gegebenen Mittelwerte auf einen signifikanten Unterschied zwischen der voltammetrischen und der UV Detektion geprüft (Doerffel, S. 116 [114]). Die Durchführung des t-Tests ergab auf einem Signifikanzniveau von 98 % für alle Mittelwerte - ausgenommen DQ mit MPV - mit voltammetrischer Detektion keinen signifikanten Unterschied.

Bei keiner der Detektionsmethoden traten in den Chromatogrammen der Festphasenextrakte undotierter Proben ($n = 4$) Peaks auf, es konnten also keine Herbizide oder koeluierende Substanzen nachgewiesen werden.

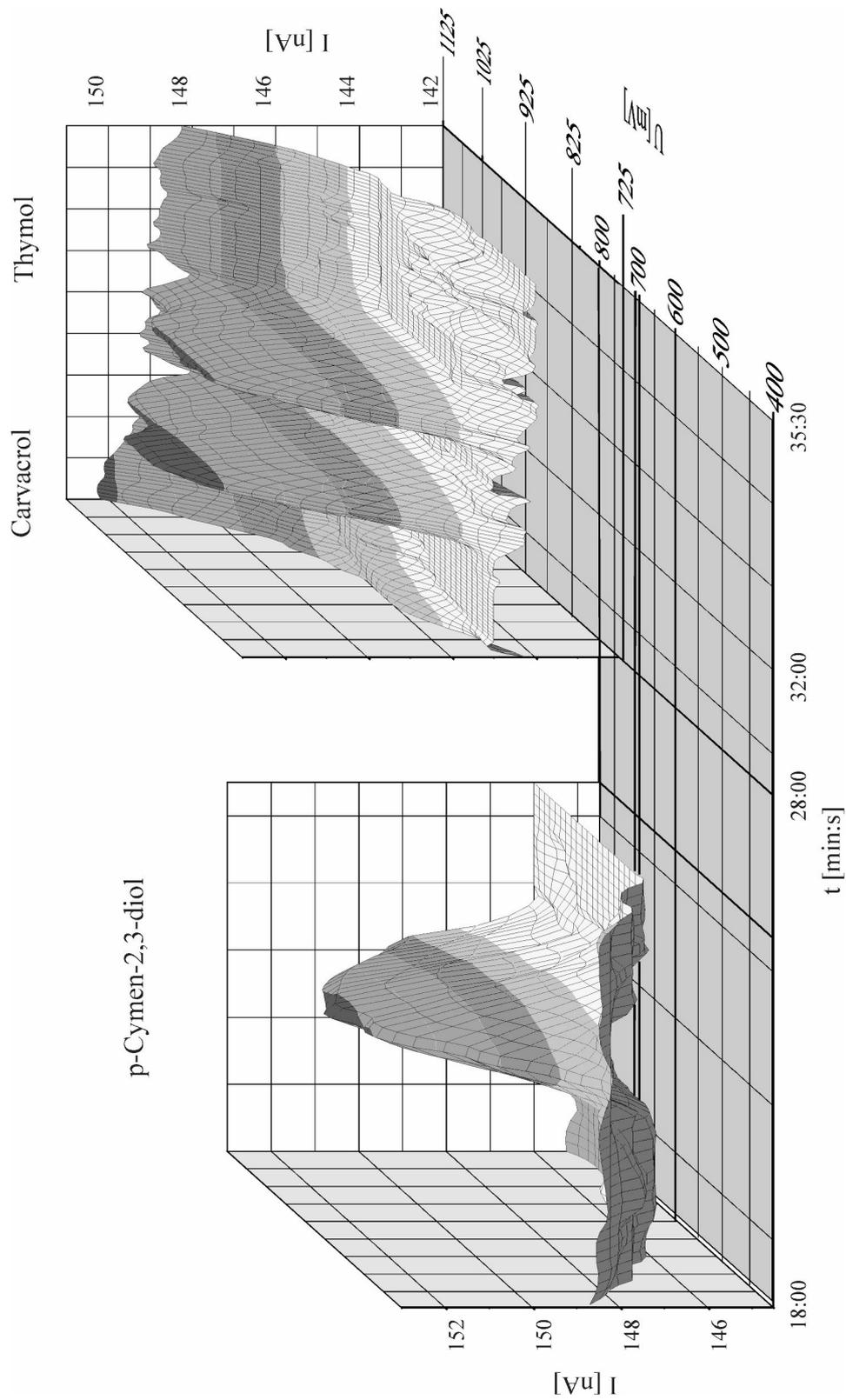


Abb. 4.28: Chromatogramm mit HPLC-HDVD der drei Phenole p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol ($c = 33 \mu\text{g/mL}$), Detektionstechnik Differenzpuls Voltammetrie

p-Cymen-2,3-diol Reaktionsprodukt von
p-Cymen-2,3-diol unter Sauerstoffeinwirkung

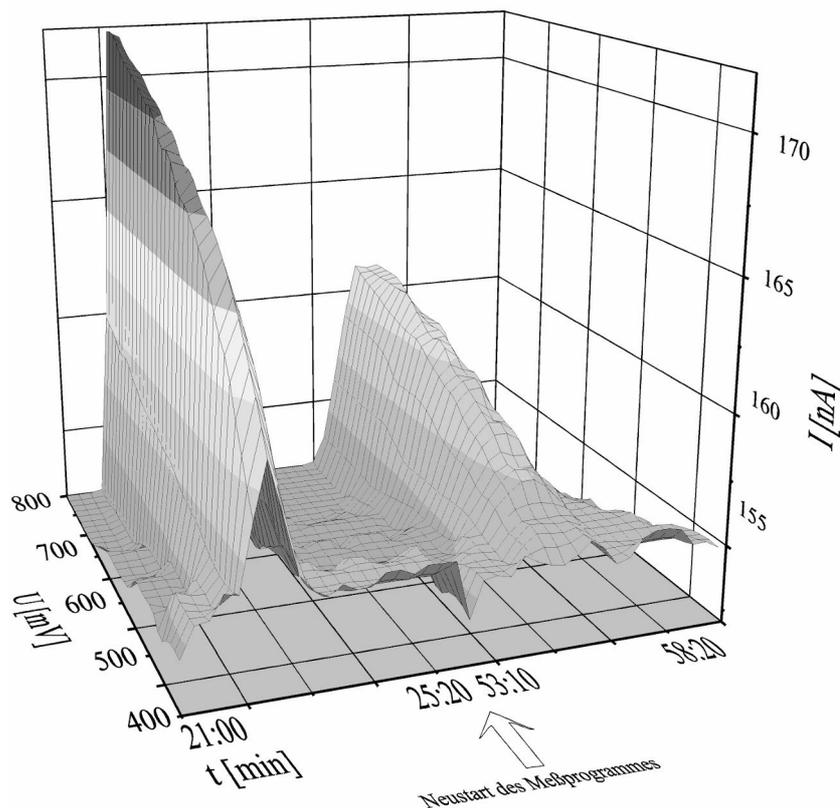


Abb. 4.29.a: HPLC-HDVD Chromatogramm eines unbekanntes Reaktionsproduktes, das bei der Lagerung von p-Cymen-2,3-diol Lösungen unter Zutritt von Sauerstoff und Licht entsteht.

Chromatogramm dieses Reaktionsansatzes in der Verdünnung 1:9 ist in Abbildung 4.29.a zu sehen. Die hydrodynamischen Voltammogramme des Reaktionsproduktes und von p-Cymen-2,3-diol waren stufenförmig, das Halbstufenpotential der neuen Verbindung konnte mit +530 mV vs. Ag/AgCl am Wendepunkt der Kurve $I = f(U)$ bestimmt werden (Abb. 29.b). Damit wird deutlich, daß das Abbauprodukt von p-Cymen-2,3-diol immer noch eine Redoxreaktivität besitzt und das Potential, bei der die Oxidation beider Verbindungen einsetzt, ähnlich ist. Die hydrodynamischen Voltammogramme von p-Cymen-2,3-diol sind hier auch stufenförmig, was mit der hohen Konzentration des Analyten (maximal 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für das Diol) zusammenhängen kann.

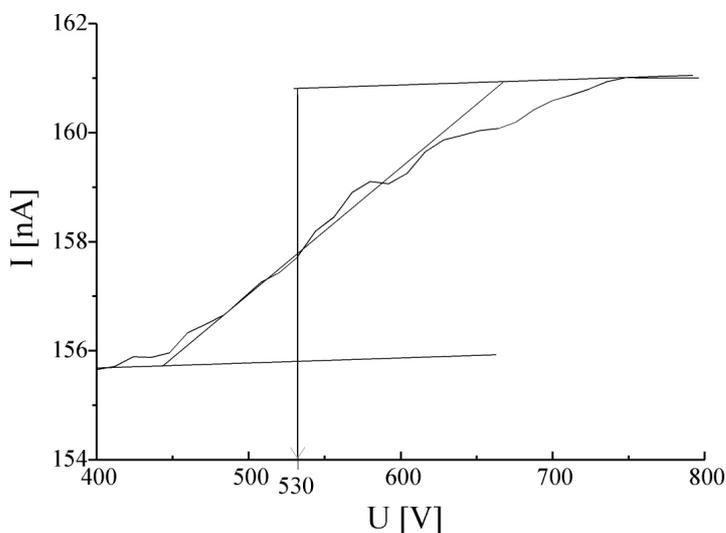


Abb. 4.29.b: Voltammogramm des Reaktionsproduktes am Peakmaximum, identischer Datensatz wie in Abb. 4.29.a, Bestimmung des Halbstufenpotentials am Wendepunkt der Funktion $I = f(U)$

4.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Chromatographie und Festphasenextraktion

Alle vier quaternären Ammoniumverbindungen waren mit einer Kieselgelsäule und isokratischer Elution innerhalb von 15 Minuten erstmalig basislinientrennbar (Kap. 4.1.2). Die Diffusion trägt hier nach der Van Deemter-Theorie erheblich zur Bodenhöhe bei, da schon bei kleinen Retentionszeiten eine starke Peakverbreiterung auftrat (Abb. 4.1, S. 44). Dies erklärt die um Faktor drei erhöhte Nachweisgrenze des Difenzquoats gegenüber den drei zuerst eluierenden Analyten. Bezüglich der bereits publizierten chromatographischen Trennung [83, 84] wies die hier vorgestellte Methode den Vorteil der isokratischen Elution, den möglichen Einsatz von EQ als internen Standard und eine drifffreie Basislinie auf.

Die Festphasenextraktion zur Anreicherung der Herbizide aus Oberflächengewässern wurde in Anlehnung an bekannte Methoden entwickelt und modifiziert. Ein Elutionsprofil (Abb. 4.2, S. 45) zeigte deutlich, daß entweder schon während der Probenaufgabe oder während der Elution ein chromatographischer Prozeß auf der Festphase ablief. Dieser führte dazu, daß DF schon bei der Probenaufgabe mit einem Volumen von 1 L von der Festphase eluiert wurde. Die Menge des verwendeten Kieselgels als Festphase wurde deshalb mit 500 mg angepaßt. Die Wiederfindungsraten von DQ, PQ und EQ verschlechterten sich bei einer weiteren Erhöhung der Kieselgelmenge. Die Wiederfindungsraten betragen mit der adaptierten Methode 42 % für DQ, 83 % für PQ, 103 % EQ und 82 % für DF. In der Literatur wurden Schwierigkeiten in der Analyse von DQ bereits von Lauren und Agnew beschrieben, die die schlechte Wiederfindungsraten mit der Adsorption von DQ an Gefäßwandungen erklärten [123]. Die verfrühte Elution von DF führte zu einer Standardabweichung von 13% in den Wiederfindungsraten. Mit der Festphasenextraktion sollte lediglich realistisches Probenmaterial hergestellt werden, und die hier erzielten Wiederfindungsraten waren ausreichend für das HPLC-HDVD System.

Vorversuche im Batch

Im Batch wurden Rechteck und Differenzpuls voltammetrische Messungen mit DQ, PQ und DF durchgeführt (Kap. 4.1.3, S. 46). Für diese differentiellen Meßtechniken ergab sich eine optimale Pulshöhe von 30 mV. Die Rechteck Voltammetrie ist für die reversiblen Systeme DQ und PQ erwartungsgemäß nachweisstärker, hier ca. um den Faktor 3, gegenüber der Differenzpuls Polarographie (Abb. 4.4, S. 48). Für DF verhält sich die Nachweisstärke genau umgekehrt. Nach den Ergebnissen im Batch-Versuch sollten demnach im fließenden System DQ, PQ und EQ mit SQWV und DF mit DPV detektiert werden. Die Nachweisstärke der hier durchgeführten Messungen war wesentlich geringer, als die bereits publizierte Rechteck

voltammetrische Methode zur Bestimmung von DQ und PQ. Die elektrochemischen Parameter waren bereits in Anlehnung an die dort vorgegebenen Bedingungen gewählt worden, nur der Grundelektrolyt differierte in der Zusammensetzung.

Es wurde der Zusatz oberflächenaktiver Substanzen zur Verhinderung adsorptiver Peaks, wie von der Arbeitsgruppe Walcarius und Lamberts [97] vorgeschlagen, geprüft. Die aus der Literatur bekannten Versuchsbedingungen wurden übertragen, jedoch hatten der Zusatz von Gelatine oder Triton X einen eher negativen Einfluß auf die Signalintensitäten (Abb. 4.10, S. 52). Somit konnte die Verwendung oberflächenaktiver Substanzen im Grundelektrolyten nicht zu der von Walcarius und Lamberts beschriebenen Empfindlichkeitssteigerung führen. Dieses ist plausibel, da die Adsorptionsschicht auf der Elektrodenoberfläche eine Passivierung verursachen kann. Es sprechen auch rein praktische Gründe gegen eine Modifikation des Grundelektrolyten, der auch Eluent ist, mit oberflächenaktiven Substanzen, da diese mit einer Veränderung des Retentionsverhaltens der Analyten einhergehen kann und Gelatine als Additiv die Haltbarkeit des Eluenten aufgrund ihrer Verderblichkeit einschränkt. Aber es wird ebenfalls deutlich, wie die Flexibilität in der Wahl des Grundelektrolyten in der elektrochemischen Analytik durch die Kopplung mit der HPLC eingeschränkt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen im Batch-Modus war der Grundlinienverlauf bei stark negativen Potentialen. Dort trat ein lokales Maximum bei Potentialen kleiner $-1,4$ V auf, also in dem Potentialbereich, in dem die elektrochemische Aktivität des Difenzoquats einsetzt (Abb. 4.5, S. 49). Die Intensität dieses lokalen Maximums korrelierte mit sinkendem pH-Wert (Abb. 4.7, S. 50). Dieser Zusammenhang spricht für eine katalytische Wasserstoffabscheidung, die der eigentlichen Wasserstoffabscheidung vorgelagert ist, als Ursache für diesen Untergrundstrom. Da die Wasserstoffabscheidung unter Verbrauch von Protonen abläuft, muß eine Erniedrigung des pH-Wertes zum verstärkten Ablauf der elektrochemischen Reaktion führen und somit zu erhöhten Peakströmen. Es wurde deshalb versucht, eventuelle Verunreinigungen, die katalytisch wirksam sein könnten, durch die Verwendung hochreiner Reagentien im Grundelektrolyten und durch den Einsatz einer anderen Quecksilberqualität aus dem System zu eliminieren (Abb. 4.6, S. 50). Es konnten jedoch keine Bedingungen gefunden werden, bei denen mit einer Erniedrigung des störenden Signals nicht auch eine Minimierung des Analytsignals verbunden war.

Versuche im fließenden System

Die ersten Versuche mit der HMDE für die elektrochemische Detektion im Rahmen dieser Arbeit wurden im amperometrischen Meßmodus durchgeführt. Die Detektion bei einer konstanten Arbeitsspannung sollte wesentlich einfacher zu realisieren sein, als die on-line

scannende Voltammetrie und sie sollte Vergleichsdaten zu bereits publizierten Messungen liefern [2].

Die amperometrische Detektion am hängenden Quecksilbertropfen wurde in beiden EFTA Zellen getestet. In beiden Detektorzellen trat jedoch nach der Elution des Diquats ein Grundlinienversatz auf, die Grundlinie kehrte nicht auf ihren Ausgangswert zurück (Abb. 4.20, S.65). Die nachfolgend eluierenden Analyten wurden nicht mit den zu erwartenden Peakhöhen detektiert. Die Grundlinie erreichte erst nach der Erzeugung einer neuen HMDE ihren ursprünglichen Wert. Durch einen in Reihe geschalteten UVD konnte abgesichert werden, daß es sich um ein Problem handelte, das in direktem Zusammenhang mit den Vorgängen in der EFTA stand. Da die Chromatogramme, die mit scannender voltammetrischer Detektion an der HMDE in beiden EFTAs aufgenommen wurden, einen einwandfreien Grundlinienverlauf aufwiesen, bestand die Möglichkeit, daß eine störende adsorptive Schicht, die diesen Grundlinienversatz verursachen könnte, durch das Scannen wieder entfernt wurde. Gegen eine Veränderung der Oberfläche durch Adsorption von elektrochemisch aktiven Verbindungen, die für den Grundlinienversatz verantwortlich sein könnte, sprach die Tatsache, daß diese Störung bei amperometrischen Messungen an der MFE in der Wall-Jet Zelle nicht auftrat. Ebenso war eine Passivierung unwahrscheinlich, da der Grundstrom gegenüber dem Normalzustand erniedrigt wurde, eine Passivierung jedoch mit der Erhöhung des Grundstromes bei reduktiver Detektion einhergehen mußte. Offensichtlich hing dieses Problem mit der Zellarchitektur und dem Arbeiten bei konstantem Potential zusammen.

Es wurden dann Versuche mit scannender Voltammetrie an der HMDE in der EFTA durchgeführt. Mit der in Kapitel 4.1.2 vorgestellten HPLC-Trennmethode und der Kopplung mit dem VA Prozessor 694, sowie dem VA Stand 693 unter Verwendung der Durchflußzelle EFTA konnten die vier quaternären Ammoniumverbindungen bei einer Konzentration von 30 µg/mL je Analyt mit Differenzpuls Voltammetrie on-line detektiert werden. Damit konnte für die vier quaternären Ammoniumverbindungen erstmals eine HPLC-Trennung präsentiert werden, bei der mit einer Proben-Injektion die Halbstufenpotentiale aller Analyten ermittelt wurden. Die Analyten DQ, PQ und EQ, welche elektrochemisch interferieren, waren durch die HPLC-Trennung in Kopplung mit der on-line scannenden Voltammetrie in einer Probe parallel zu analysieren. Eine Reihe von Versuchen diente der Optimierung der Methode. Gegenstand der Optimierung waren folgende Punkte (■):

■ Die Nachweisstärke und Reproduzierbarkeit des HPLC-HDVD Systems

Hier stellte sich die Frage, ob die scannende Voltammetrie prinzipiell mit einem Verlust an Nachweisstärke einhergeht, gegenüber der Voltammetrie mit konstanter Arbeitsspannung (Amperometrie). Die Hauptursache für niedrige Reproduzierbarkeiten wurde in den niedrigen Abstraten gesehen, die die Anzahl der Datenpunkte über einen chroma-

tographischen Peak bestimmten. Bei der Verwendung des VA Prozessors unter optimierten Bedingungen lagen diese für DQ unter 11 Meßpunkten. Ebenfalls soll der Beitrag der HMDE auf die analytischen Kenngrößen beurteilt werden.

Trotz der instrumentellen Schwierigkeiten, die amperometrische Detektion an der HMDE mit den Detektorzellen vom EFTA-Typ zu realisieren, gelang es, die Zelle so zusammenzusetzen, daß Chromatogramme mit einwandfreier Peakform und Grundlinienverlauf erhalten werden konnten. Diese Situation wurde genutzt, um die Messungen mit amperometrischer Detektion durchzuführen und die geforderten Daten zu gewinnen. Die Nachweisgrenzen mit amperometrischer Detektion waren für DQ um den Faktor drei erniedrigt gegenüber der Detektion mit DC Voltammetrie unter sonst identischen Bedingungen (Kap. 4.1.5, Tabellen 4.4 und 4.5). Für EQ war die Nachweisgrenze um den Faktor zwei erniedrigt. Ein weiterer Vergleich zwischen den Detektionsmethoden Amperometrie und Multipuls Voltammetrie fand an der MFE in der Wall-Jet Zelle statt (Kap. 4.1.6, Tabelle 4.8). Hier konnte kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Die Vergleichsmessungen an der HMDE bestätigen die theoretische Überlegung, nach der bei amperometrischen Messungen ein besseres Signal zu Rausch Verhältnis erzielt wird, da hier die gesamte Meßdauer für eine Spannung aufgebracht werden kann, während diese bei scannenden Verfahren auf viele Spannungen verteilt wird. Dieses ist analog zu massenspektroskopischen Messungen in Kopplung mit chromatographischen Verfahren zu sehen, bei denen im Selected Ion Monitoring Modus gemessen wird, wenn eine besonders hohe Nachweisstärke und Empfindlichkeit gefordert werden.

Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeiten unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeiten erwies sich die Stufenhöhe (U_{step}), die die Spannungsvorschubgeschwindigkeit der digitalen Spannungsrampen maßgeblich beeinflusst, als wesentlich stärkerer Einflußparameter als die Spannungsvorschubgeschwindigkeit selber. Mit sehr hohen Spannungsvorschubgeschwindigkeiten von bis zu 2 V/s gegenüber 0,5 V/s wurde die Zahl der Meßpunkte z. B. von 12 auf 19 bei DQ erhöht. Der prozentual geringe Anteil der Scandauer an der Gesamtdauer einer Wiederholung machte eine stärkere Erhöhung der Meßpunktzahl unmöglich. Gerade bei sehr großen Spannungsfenstern mußte vor jeder Rampe eine Equilibrierungszeit von mindestens einer Sekunde eingestellt werden, um hohe kapazitive Ladeströme während der Messung zu vermeiden.

Interessant für die Beurteilung der Reproduzierbarkeiten ist hier ein Blick auf die amperometrischen Messungen. Legt man bei der Amperometrie ein Meßintervall von 0,1 s zugrunde und eine Peakbasisbreite von 120 s, resultieren daraus 1200 Datenpunkte, die einen chromatographischen Peak beschreiben. Besonders die hohen Standardabweichungen bei der amperometrischen reduktiven Detektion an der HMDE zeigen, daß auch hier die hohe

Abtastrate bezüglich der Retentionszeit die Reproduzierbarkeit der Parallelbestimmungen nicht erhöhen konnte.

Ein weiterer kritischer Punkt im System, der ursächlich für die hohen Standardabweichungen sein könnte, ist die Generierung der HMDE, für die keine Literaturdaten vorlagen. Da keine Zahlen über die Reproduzierbarkeit in der Herstellung der HMDE ermittelt werden konnten, ist ein Blick auf die Methoden mit Anwendung der HMDE angebracht. An der HMDE werden für die Schwermetalle Cu und Zn Bestimmungsgrenzen von 1 ng/mL und für Cd, Co, Ni, Pb, und Tl von 0,1 ng/mL mit Stripping Voltammetrie angegeben [124, 125]. Die Standardabweichungen liegen hierbei unter 5 % und in diese Standardabweichungen geht unter anderem die Reproduzierbarkeit in der Herstellung der HMDE ein, da jede Messung an einer neuen HMDE durchgeführt wird. Sauer und Spahn berichten von relativen Standardabweichungen kleiner 1 % für Stripping Voltammetrie in der Durchflußzelle EFTA, auch hier wird für jede Einzelmessung ein neuer Tropfen erzeugt [35]. Die in den genannten Quellen publizierten Daten wurden mit der Multimode Elektrode und dem VA Stand von Metrohm gewonnen. Der Beitrag der HMDE zu den hohen Standardabweichungen bei der on-line scannenden HPLC Detektion sollte diesen Hinweisen zufolge gering sein.

Der Einfluß der Tropfengröße auf Peakhöhen, Reproduzierbarkeiten und Nachweisgrenzen wurde mit DC Voltammetrie und Amperometrie an der HMDE in der EFTA mit herkömmlicher Kanalplatte untersucht (Kap 4.1.5, S. 70 - 76). Bei der scannenden Voltammetrie konnte für DQ, PQ und EQ eine deutliche Korrelation zwischen steigenden Tropfengrößen und steigenden chromatographischen Peakhöhen festgestellt werden. Der gleiche Zusammenhang galt auch zwischen Tropfengröße und Standardabweichung, so daß kein Einfluß auf die Nachweisgrenzen festzustellen war, da für diese hier das dreifache Signal zu Rausch Verhältnis zugrunde gelegt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die theoretischen Überlegungen, nach denen der voltammetrische Peakstrom proportional zur Elektrodenoberfläche ist (Gleichung 3.5). Gleichzeitig steigt jedoch auch der kapazitive Ladestrom, je größer die Elektrodenoberfläche ist. Auch in der Amperometrie waren die Peakhöhen bei maximaler Tropfengröße am höchsten (Tabelle 4.5, S. 72), für die Nachweisgrenzen war ebenfalls keine eindeutige Tendenz auszumachen.

Die Nachweisstärke und Reproduzierbarkeiten konnten demnach nicht auf konkrete Randbedingungen zurückgeführt werden. Es ist vielmehr davon auszugehen, daß mehrere instrumentelle Aspekte in Frage kommen. Es sind drei Punkte zu nennen:

- Da bei der ursprünglichen Funktionsweise der EFTA der Analyt zwar in fließender Lösung angereichert wird, die eigentliche Messung jedoch in ruhender Lösung geschieht, ist die große Empfind-

lichkeit, die mit dieser Messzelle in der Stripping Voltammetrie erreicht werden kann, nicht direkt auf das HPLC-HDVD System übertragbar.

- Verdünnung des Analyten im HPLC-System gegenüber der injizierten Probe
- Die Parameter der Voltammetrie im fließenden System mußten den Erfordernissen der Durchflußanalytik angepaßt werden (z. B. hohe Spannungsvorschubgeschwindigkeiten), es können nicht die optimalen Parameter eingestellt werden, die für maximale Empfindlichkeit notwendig wären.

Desweiteren können elektrochemische Schwierigkeiten entscheidend sein:

- Schon in den Batch Versuchen zeigte sich deren geringere Nachweisstärke im Vergleich zu Literaturdaten, die im Batch erzielt worden waren.
- Ein Nachteil der HMDE ist die mögliche Elektrodenpassivierung. Diese Möglichkeit besteht gerade bei den Herbiziden mit hoher Oberflächenaktivität.

- Die geringe Lebensdauer der HMDE in der EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur
Die Lebensdauer einer HMDE unterschritt immer die Dauer eines Chromatogrammes (ca. 17 min) und lag oft bei nur wenigen Sekunden. Die maximal erreichte Lebensdauer war stark von der Qualität der Glaskapillare und des Einbaus abhängig, wobei positive Ergebnisse zufällig erzielt wurden.

Die EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur ist nicht für Messungen an der HMDE konzipiert worden, die eine Lebensdauer von mehreren Minuten erfordern.

Faktoren, die zum Abfallen des Quecksilbertropfens führen können, sind die Erdanziehungskraft, die dem Auftrieb der HMDE entgegenwirkt und die Kraft durch den aufprallenden Elutionsstrom. Letztere wirkt rechtwinklig bezüglich der Erdanziehungskraft. Eine Anordnung der Zuflußkapillare, die der Erdanziehungskraft genau entgegenwirkt, sollte sich positiv auf die Lebensdauer der HMDE auswirken. Hier besteht jedoch das Problem, daß der Elektrolyt dann verstärkt in die Kapillaröffnung gedrückt wird. Negative Potentiale kleiner -1 V führen dann innerhalb der Kapillare zu einer Wasserstoffabscheidung. Daraus läßt sich ableiten, daß ein optimaler Winkel für die Anströmung der HMDE zwischen 90° und 180° bezüglich der Glaskapillare liegt. Die H₂-Gasblasen verdrängen den sehr dünnen Quecksilberfaden. Der

elektrische Kontakt wird unterbrochen und man mißt nur noch elektronisches Grundrauschen. Zusätzlich führt eine vermehrte Wasserstoffabscheidung zum Tropfenabfall. Ternes gibt ein minimales Potential von -1,4 V für die HMDE in der elektrochemischen HPLC Detektion an [2].

Die oben erwähnte Wasserstoffabscheidung in der Glaskapillare tritt nicht nur bei ungünstigen Strömungsverhältnissen auf, sondern ist ein generelles Problem bei der Verwendung von Glaskapillaren. Hier könnte die Verwendung von Werkstoffen mit hydrophober Oberfläche Abhilfe schaffen. Eine Perspektive für die Optimierung der Zellarchitektur für die Verwendung der HMDE in der elektrochemischen HPLC-Detektion ist demnach in folgenden Punkten zu sehen:

- Einstellung eines Anströmwinkels von etwa 135° bezüglich der Glaskapillare (Abb. 4.14), der bereits in der Arbeit von Ternes gewählt worden war [2]
- Verwendung von Glaskapillaren mit hydrophober Oberfläche oder aus Kunststoff

Die hier gesammelten Erfahrungen wurden zur Optimierung des Zelldesigns und der Strömungsverhältnisse der EFTA herangezogen. Von der Firma Metrohm wurde der Prototyp einer W-Kanal EFTA zur Verfügung gestellt, wobei der Winkel von 135° keiner gesonderten Optimierung unterlag. Zusätzlich sind Glaskapillaren erhältlich, bei denen die Oberfläche durch Silanisierung deaktiviert wurde. In Kombination mit der W-Kanal EFTA wurden diese Kapillaren für weitere Versuche eingesetzt. Mit dieser Konfiguration konnten auf Anhieb zuverlässig HMDEs mit der für die HPLC obligaten Lebensdauer generiert werden. Damit wurde die instrumentelle Voraussetzung geschaffen, die HMDE in der elektrochemischen HPLC Detektion einzusetzen.

▣ Restriktionen durch den Potentiostaten (VA Prozessor)

Mit dem VA Prozessor kann eine maximale Anzahl von Datenpunkten gehandhabt werden, diese reichte für on-line scannende Detektion nicht aus. Die niedrigen Spannungsvorschubgeschwindigkeiten und die schlecht automatisierbare wiederholte Ausführung der Spannungsrampen, die die Steuereinheit zuläßt, schränkten den Einsatz dieses Meßgerätes für die on-line scannende Voltammetrie als Detektionsmethode für die HPLC stark ein.

Die Parameter U_{step} und t_{step} , die maßgeblich die Spannungsvorschubgeschwindigkeit bestimmen, sowie die Potentialfensterweite wurden optimiert (Kap. 4.1.5). Die hiermit erreichte durchschnittliche Abtastrate (Meßpunkte pro Zeiteinheit) bezüglich der Retentionszeit mit

ca. 20 Punkten über einen chromatographischen Peak (Tabelle 4.7, S. 76), bewegte sich in der Größenordnung der geforderten Mindestzahl von 15 [16].

Als weiteres Beispiel für die Begrenzung des VA Prozessors in der Anwendung für die on-line scannende Voltammetrie waren Messungen mit DC Spannungsrampen. Der hierfür vom Meßgerät bereitgestellte "CYCmode" war nicht für eine Automatisierung des wiederholten Abfahrens von DC Spannungsrampen geeignet. Der Grund lag in der Programmstruktur, bei der zwischen zwei Blöcken die Detektorspannung ausgeschaltet wurde, ein geräteimmanenter Fehler, der nicht umgangen werden konnte. Bei der ersten Spannungsrampe eines jeden Blocks resultierten daraus sehr hohe kapazitive Ladeströme, diese nahmen von Rampe zu Rampe ab, bis der nächste Block einsetzte. Ein zweidimensionales Chromatogramm bei einer Spannung wies einen sägezahnartigen Grundlinienverlauf auf. Dieser Meßmodus war deshalb nicht für die on-line scannende voltammetrische Detektion geeignet.

Deshalb wurde ein zweiter Potentiostat und zwei Versionen der zugehörigen Steuerungssoftware hinsichtlich ihrer Eignung für diese Detektionsmethode geprüft. Mit dem μ Autolab (Eco Chemie, Utrecht) kristallisierten sich drei Möglichkeiten für die on-line scannende Voltammetrie heraus:

1. Stapelweises Aufrufen der Meßmethode, Starten der Methode und Speichern der Meßwerte mit dem Steuerungsprogramm GPES 3.4 unter dem Betriebssystem DOS
2. Vollautomatische Messung mit DC Voltammetrie mit dem Steuerungsprogramm GPES 4.4 unter dem Betriebssystem Windows 3.1
3. Vollautomatische Messung mit Multipuls Voltammetrie mit GPES 4.4 als DC Variante mit maximal 10 Meßpunkten pro Voltammogramm (Abb. 4.27.a, S. 80)

Diese Anwendungen zeichneten sich durch bessere Automatisierbarkeit, größere Spannungsfenster und Flexibilität in den Spannungsvorschubgeschwindigkeiten gegenüber dem VA Prozessor aus. Der DC-Modus der Software GPES 4.4 zur Steuerung des μ Autolabs ist vom Hersteller nicht für die on-line scannende voltammetrische Detektion in der HPLC konzipiert worden und bisher sind noch keine Applikationen mit dieser Zielrichtung bekannt. Mit der hier vorgestellten Methode (Kap. 4.1.2, S. 70) konnte der Anwendungsbereich für den Potentiostaten erweitert werden. Weitere Optimierungsversuche sowie die Messungen der Realproben wurden mit Hilfe des μ Autolab durchgeführt.

■ Die Handhabbarkeit und Automatisierbarkeit der Analyse

Hier sind zwei Punkte zu nennen: Die Entfernung von Luftblasen aus der Detektorzelle konnte nicht automatisch geschehen. Die Luftblase mußte zunächst visuell erkannt wer-

den (hier entsteht die Notwendigkeit transparenten Kunststoff als Werkstoff für die Zelle einzusetzen), dann mußte die HMDE entfernt werden (Abschlagen per Hand) und die Luftblase durch Erhöhung des Flusses aus der Zelle entfernt werden. Zweitens war die Generierung der neuen HMDE nicht automatisierbar. Zwar sieht der VA Prozessor grundsätzlich diese Möglichkeit vor, die Entstehung der neuen HMDE mußte aber immer visuell überprüft werden. Diese Umstände sind im Pilotbetrieb tragbar, jedoch nicht für eine professionelle Nutzung des Systems. Allerdings ist eine Optimierung der Handhabbarkeit erst dann lohnend, wenn sich mit dem System hervorragende Ergebnisse erzielen lassen.

Als alternatives Detektionssystem für den reduktiven Bereich wurde die Quecksilberfilmelektrode (mercury film electrode MFE) eingesetzt. Zwar zeigt die Tabelle 3.3 (S. 9), daß der Potentialbereich der MFE den der Glaskohle-Elektrode um -200 mV übertrifft, diese Werte sind jedoch nur Anhaltspunkte. Da die Inertheit von dem pH-Wert, der Polarität des Solvents und der genauen Beschaffenheit der Elektrode selber abhängt, muß der Arbeitsbereich in jedem Fall individuell geprüft werden. Die MFE konnte sehr leicht in situ in der EFTA mit herkömmlichen Zelldesign und der Wall-Jet Zelle generiert werden. Die MFE wies eine Lebensdauer von mehreren Tagen auf und die Zerstörung des Quecksilberfilms war deutlich an einer abrupten Erhöhung des Untergrundstromes zu erkennen. Es mußten keine besonderen Maßnahmen getroffen werden, um den Film über Nacht zu stabilisieren. Die Aufbringung des Quecksilberfilms machte durch die deutliche Erniedrigung des Untergrundstroms gegenüber der unbehandelten Glaskohle-Elektrode eine Messung erst möglich. Die MFE nahm somit in ihren elektrochemischen Eigenschaften einen Platz zwischen der Glaskohle Elektrode und der HMDE ein und es wurde ein Potentialbereich bis zu -0,8 V mit der MFE abgedeckt.

Die Standardabweichungen von Messungen an der MFE in der EFTA, sowie in der Wall-Jet Zelle lagen zwischen 9 und 18 % relativer Standardabweichung. Eine Passivierung der Elektrodenoberfläche durch Adsorption von Analyten, welche stark oberflächenaktiv sind, war als Erklärung auszuschließen, da diese eine systematische Erniedrigung der Peakströme zur Folge gehabt hätte. Generell ist ein Quecksilberfilm anfällig gegenüber Flußschwankungen und in das System eindringender Luftsauerstoff [54]. Die Bezeichnung "Film" entspricht nicht der mikroskopischen Struktur der Quecksilberoberfläche. Vielmehr setzt sich der Film aus winzigen Tröpfchen zusammen. Auffällig war eine Erhöhung des ersten Messwertes an einem neu generierten Film bei hintereinander erfolgten Bestimmungen. Hier bestand durchaus die Möglichkeit einer Passivierung durch Adsorption von Analyten auf der Quecksilberoberfläche.

Mit der MFE in der Wall-Jet Zelle konnte ein Detektionssystem für die Analyse der quaternären Ammoniumverbindungen DQ, PQ und EQ vorgestellt werden, das aus instrumentellen Komponenten, die in analytischen Laboratorien oft bereits vorhanden sind, zusammengesetzt werden kann.

Vergleich der Meßmethoden untereinander und mit bereits publizierten Methoden

Die Aufgabenstellung sieht die Einrichtung, Optimierung und Validierung der scannenden voltammetrischen Detektion in Kopplung mit der HPLC vor. Für diese Entwicklung wurde ein sehr gut bekanntes analytisches Testsystem ausgewählt. Die hier gewählten Herbizide sind trotz der Vielzahl bereits bestehender analytischer Methoden ein beliebtes Testsystem für neue Verfahren, wie z. B. die Bestimmung von Paraquat im Immuno-Assay [126] und die Bestimmung von Paraquat mit einem PQ-selektiven potentiometrischen Sensor [100, 101]. Es steht also nicht die Entwicklung einer Methode im Vordergrund, die eine bisher etablierte Methode ersetzen soll. Ein Blick auf die Grenzwerte, die in der Trinkwasserverordnung festgelegt sind, bietet eine Orientierung und Zielvorgabe für neue Entwicklungen. Diese betragen für organisch-chemische Stoffe zur Pflanzenbehandlung und Schädlingsbekämpfung für die einzelne Substanz 0,1 ng/mL und in der Summe 0,5 ng/mL [127]. Ein analytisches Verfahren zur Überwachung der Grenzwerte muß eine maximale Bestimmungsgrenze von maximal einem Drittel der Höchstmenge aufweisen [128].

Für die Bestimmung von HPLC-UVD werden von Carneiro und Mitarbeitern Nachweisgrenzen um 3 ng/mL (DQ und PQ) sowie 5,5 ng/mL angegeben [77]. Die Nachweisgrenzen, die von derselben Arbeitsgruppe mit Capillar-Elektrophorese (CE) erzielt wurden, liegen leicht darunter. Diese Ergebnisse stehen den in dieser Arbeit erzielten Nachweisgrenzen um 100 ng/mL (DQ, PQ und EQ) sowie 310 ng/mL (DF) mit HPLC-UVD gegenüber.

Bei den elektrochemischen Vorversuchen im Batch führten alle geprüften Einstellungen der Parameter zu wesentlich nachweisschwächeren Messungen (NWG DQ: 40 ng/mL, PQ: 84 ng/mL) als die von Walcarius und Lamberts präsentierte Methode (NWG DQ: 5,4 ng/mL, PQ: 3,9 ng/mL) [97]. Da die Parameter - soweit möglich - übereinstimmend gewählt wurden, kann die Ursache für diesen Unterschied nicht auf die Versuchsbedingungen zurückgeführt werden. Die Halbstufenpotentiale betragen -470 mV (DQ), -490 mV (PQ) und -1480 mV (DF) vs. Ag/AgCl. Luque und Mitarbeiter erzielten mit amperometrischer Detektion an einer oberflächenaktivierten Glaskohle Elektrode Nachweisgrenzen von 4,8 ng/mL (DQ) und 6,3 ng/mL (PQ) [99]. Alle elektrochemischen Methoden im Batch und in der Fließinjektionsanalyse sind nicht in der Lage, DQ, PQ und Ethylparaquat als internen Standard zu unterscheiden. Hier besteht die Gefahr falsch positiver Nachweise. Methoden, die für die parallele

Analyse mehrerer Analyten konzipiert wurden, sind oft weniger empfindlich und nachweisstark, verglichen mit einer Methode, mit der nur ein Analyt quantifizierbar ist.

Interessant ist ein Vergleich der in Tabelle 4.5, S. 72 gegebenen Daten, die mit amperometrischer Detektion an der HMDE gewonnenen wurden (NWG DQ: 400 ng/mL, PQ: 700 ng/mL), mit denen von Ternes (NWG DQ, PQ: 360 ng/g) [2]. Hier ist zu berücksichtigen, daß die letzteren Nachweisgrenzen für die Bestimmung der Herbizide in Leber angegeben werden und somit eine aufwendige Probenaufarbeitung und ein Anreicherungsfaktor von 10 in die Bestimmung mit eingehen. Es läßt sich aber ableiten, daß mit der neuen instrumentellen Konfiguration kein Vorteil bezüglich der Nachweisgrenzen gegenüber der bereits bekannten Konfiguration erreicht wurde. Das bedeutet, mit der hier entwickelten Methode kann die Analyse mit gleicher Empfindlichkeit wie bei Ternes unter Gewinn der Halbstufenpotentiale oder einer höheren Peakreinheit durchgeführt werden. Die hydrodynamischen Voltammogramme, die von Ternes aufgenommen wurden, lieferten die Halbstufenpotentiale -520 mV (DQ) und -620 mV (PQ, EQ) vs. Ag/AgCl und aus den S-förmigen Kurven gingen die zweiten Reduktionsstufen der Analyten nicht hervor.

Die Nachweisgrenzen mit on-line differenzpulsvoltametrischer Detektion an der MFE in der Wall-Jet Zelle nach der HPLC-Trennung, die mit der hier entwickelten Methode erzielt wurden, betragen 1,8 µg/mL (DQ) und 5,1 µg/mL (PQ) (Tabelle 4.8, S. 78). An der HMDE konnte mit der gleichen elektrochemischen Detektionsmethode eine ca. vierfach niedrigere Nachweisgrenze erzielt werden. Weiterhin bedeutet dieses eine Erhöhung der Nachweisgrenzen gegenüber der oben vorgestellten Bestimmung im Batch um den Faktor 100 und gegenüber der literaturbekannten Methode im Batch [97] um den Faktor 1000 (Kap. 4.1.3, Abb. 4.4). Da die Probenmenge für einen chromatographischen Lauf der hier vorgestellten Methode 20 µL betrug und für die Bestimmungen im Batch 10 mL, werden bei beiden Methoden ähnliche absolute Mengen der Analyten für den Nachweis gefordert. Die Peak- und Untergundströme von Messungen an der MFE waren unter sonst gleichen Bedingungen gegenüber den Messungen an der HMDE zehnfach erhöht. Dies liegt zum einen an der wesentlich höheren Elektrodenoberfläche der MFE gegenüber der HMDE und zum anderen daran, daß der Bedeckungsgrad der MFE auf der Glaskohle Basis kleiner als 100 % ist und dadurch minimale Wasserstoffabscheidung schon bei Potentialen höher als -1 V den Grundstrom erhöhte. Die Peakströme an der MFE in der Wall-Jet Zelle waren gegenüber denen in der EFTA dreifach erhöht. Dieser Unterschied wurde möglicherweise durch die unterschiedlichen Zellvolumina und Strömungsverhältnisse verursacht. Die Ursache für die um 140 mV gegenüber allen bisherigen Messungen verschobenen Peakpotentiale in der Wall-Jet Zelle ist unbekannt.

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der gemessenen Halbstufenpotentiale $E_{1/2}$ [mV] der quaternären Ammoniumverbindungen vs. Ag/AgCl, 3 mol/L KCl

Kapitel	Seite	Methode	DQ	PQ	EQ	DF
4.1.3	48	Batch	-470	-490	-	-1480
4.1.4	62	HPLC-HDVD (DPV) herkömmliche EFTA, MFE	-470	-550	-550	-
4.1.4	62	HPLC-HDVD (DPV) Wall-Jet, MFE	-610	-690	-690	-
4.1.6	79	HPLC-HDVD (MPV) W-Kanal EFTA, HMDE	-510	-600	-600	-1410
4.1.6	81	HPLC-HDVD (DCV) W-Kanal EFTA, HMDE	-550	-620	-620	nicht ablesbar

Die in Tabelle 4.10 präsentierten Ergebnisse zeigen Differenzen, die z.T. mehr als 100 mV betragen. Diese lassen sich durch Unterschiede in der Zellarchitektur und der elektrochemischen Meßtechnik (differenziell oder DC). Der große Unterschied zwischen den Potentialen in der Wall-Jet Zelle und der EFTA läßt sich auf die Zellarchitektur, deren Einfluß noch intensiv im experimentellen Abschnitt 4.2 beschrieben wird, zurückführen. Die Zellarchitektur und der Elektrodenabstand beeinflussen das Halbstufenpotential durch den *IR*-Abfall (Kap. 3.1.4). Die Halbstufenpotentiale liefern demnach Anhaltspunkte, müssen aber immer mit dem eigenen Meßsystem und mit Vergleichssubstanzen ermittelt werden.

Untersuchung der Realproben mit HPLC-HDVD

Aus den zahlreichen Methoden mit amperometrischer Detektion und online scannender Voltammetrie nach der HPLC, die hier vorgestellt wurden, kristallisierten sich vier Methoden heraus, für die Kalibrierdaten, Reproduzierbarkeiten und Nachweisgrenzen ermittelt wurden: DP und MP Voltammetrie an der HMDE in der W-Kanal EFTA; MP Voltammetrie und Amperometrie an der Quecksilberfilmelektrode in der Wall-Jet Zelle. Die Wasserproben, die mit Kieselgel Festphasenkartuschen angereichert worden waren, wurden mit HPLC-UVD und mit HPLC-HDVD an der HMDE bestimmt. Alle elektrochemischen Meßergebnisse zeigten gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit HPLC-UVD gewonnen wurden (Kap. 4.1.6, Tabelle 4.9).

Detektion von Thymol, Carvacrol und p-Cymen-2,3-diol mit HPLC-HDVD

Durch die Verwendung des VA Prozessors mit der elektrochemischen Wall-Jet Detektorzelle für die on-line scannende DP Voltammetrie in Kopplung mit der HPLC konnte für diese drei Phenole eine Methode präsentiert werden, mit der durch eine einzige Injektion die Halbstufenpotentiale der Analyten ermittelt wurden (Kap. 4.1.7). Das Halbstufenpotential von p-Cymen-2,3-diol betrug +0,62 V und stimmte somit sehr gut mit dem Literaturwert von +0,64 V überein (Kap. 3.4.2 und [14]). Leichte Unterschiede traten bei Carvacrol und deutlich bei Thymol auf, bei denen die Literaturwerte um +0,09 V und +0,23 V von dem hier ermittelten Halbstufenpotential (+0,96 V vs. Ag/AgCl, 3 mol/L KCl) nach oben abwichen. Die Voltammogramme ermöglichen eine schnelle und zuverlässige Auswahl des Arbeitspotentials für die amperometrische Detektion, die für die Spurenanalytik eingesetzt wird. An einem praktischen Beispiel wurde gezeigt, wie ein Abbauprodukt dieser antioxidativ wirksamen Substanzen elektrochemisch charakterisiert werden kann. Wahrscheinlich verursachte die hohe Konzentration der Hauptkomponente p-Cymen-2,3-diol, die zur Messung eingesetzt worden war, die Stufenform des Voltammogramms (Abb. 4.29.a und b).

4.2 Stopped-Flow und Cyclovoltammetrie

4.2.1 Methodologie

Die Reagentien, die in diesem experimentellen Abschnitt verwendet worden sind, waren vom Reinheitsgrad für Analyse, wenn nicht anders angegeben. Das Quercetin sowie das Luteolin waren ohne Reinheitsangabe (Sigma Aldrich, Milwaukee), das Oxidationsprodukt 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon wurde nach der Vorschrift von Jungbluth aus Quercetin hergestellt [90]. Die Zusammensetzung des Grundelektrolyten bei den elektrochemischen Untersuchungen basierte auf den Komponenten des HPLC-Eluenten, der für die Trennung der Flavonoide eingesetzt wurde.

Ziel dieses experimentellen Abschnittes ist es, eine elektrochemische Charakterisierung von redoxaktiven Substanzen von dem Batch-Modus auf die HPLC Detektion zu übertragen. Dabei sollen die spezifischen Aussagen, die cyclovoltammetrische Messungen im Batch liefern, auch unter den Bedingungen der elektrochemischen HPLC Detektion gewonnen werden. Als analytisches System werden Vertreter der Flavonoide gewählt, da sie eine komplexe Elektrochemie aufweisen und cyclovoltammetrische Messungen daher spezifische Signale liefern. Für die Entwicklung dieser Detektionsmethode sind als Versuchsparameter die Spannungsvorschubgeschwindigkeit und die Flußgeschwindigkeit zu variieren, und es ist der Einfluß der Zellarchitektur zu untersuchen.

Das Redoxsystem - bestehend aus Quercetin und Cu^{2+} -Ionen - soll dann durch cyclovoltammetrische Messung im Batch und unter Verwendung der hier entwickelten Kopplungsmethode (HPLC - Cyclovoltammetrie) untersucht werden. Dabei sind möglichst viele Informationen, wie z. B. über eventuell vorhandene Übergangskomplexe, elektrochemisch zu gewinnen.

4.2.2 Elektrochemische Vorversuche mit Flavonoiden im Batch

Instrumentelles

Die Versuche im Batch wurden in einer 10 mL Meßzelle durchgeführt, die mit dem μ Autolab (Eco Chemie, Utrecht) als Potentiostaten angesteuert wurde. Es wurde eine Glaskohle Elektrode, $\varnothing = 2$ mm als Arbeitselektrode eingesetzt. Als Referenzelektrode fungierte eine Ag/AgCl Elektrode mit 3 mol/L AgCl-Lösung als Elektrolyt in wäßrigen Systemen oder 0,1 mol/L Tetrabutylammoniumfluorophosphat für nichtwässrige Systeme. Die Lösungen wurden 5 Minuten lang mit Stickstoff begast.

Cyclovoltammetrie von Quercetin unter Variation der Elektrolytzusammensetzung

Als Grundelektrolyt wurden, wenn nicht anders angegeben, 80 vol.-% Essigsäure (2 %ig) im Gemisch mit 20 vol.-% Acetonitril eingesetzt. Die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit betrug 50 mV/s. Das Potentialfenster, in der die Analyten oxidierbar waren, wurde durch die Potentiale $U_{\text{start}} = 0$ V, $U_{\text{umkehr}} = -1$ V und $U_{\text{stop}} = 0$ V gegeben. Der Scan wurde zweimal direkt hintereinander durchgeführt. Alle Daten wurden untergrundkorrigiert.

Die Messungen einer Lösung von 20 $\mu\text{g/mL}$ Quercetin in einem Gemisch aus 20 vol.-% Acetonitril und 80 vol.-% 2 %iger Essigsäure ergab vier oxidative Signale bei +0,48 V, +0,70 V,

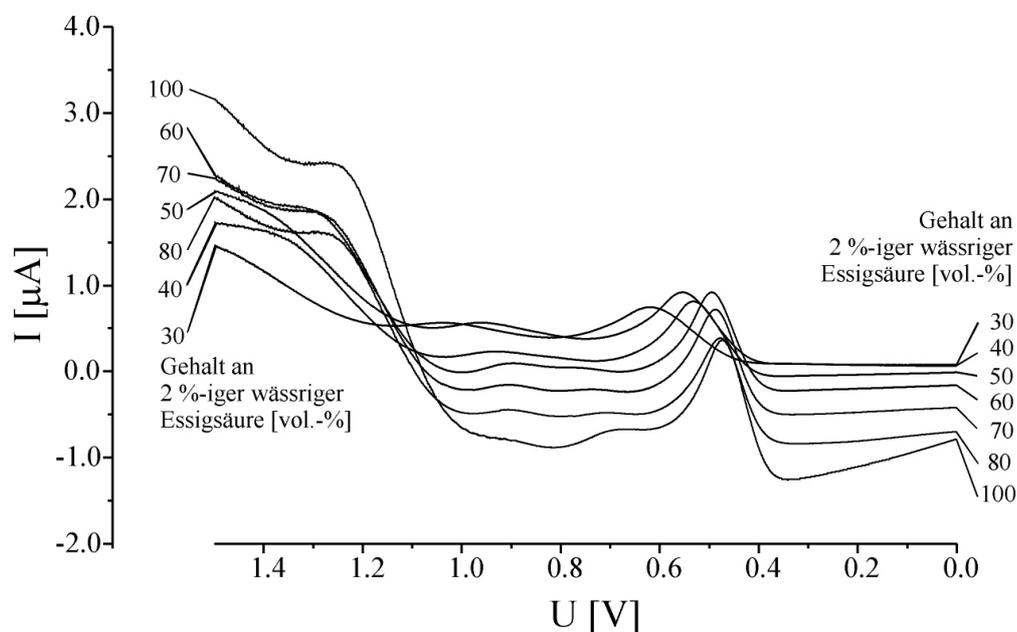


Abb. 4.30: Cyclovoltammogramme von Quercetin ($c = 20 \mu\text{g/mL}$) unter Variation des Verhältnisses von wässrigem zum Acetonitril-Anteil im Grundelektrolyten, $dU/dt = 50$ mV/s hier wird der Übersicht halber nur der Vorwärtsscan dargestellt

+ 0,90 V und +1,25 V, sowie ein reduktives Signal im Rückwärtsscan bei + 0,40 V. Die ersten drei oxidativen Signale waren peakförmig und bei dem höchstem Potential trat ein stufenförmiges Signal auf. In weiteren Versuchen wurde das Verhältnis von Acetonitril zu der wäßrigen Essigsäure variiert (Abb. 4.30). Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die beiden mittleren Signale wesentlich schwächer waren, als die Oxidationsstufen um + 0,45 V und + 1,3 V. Desweiteren fällt auf, daß bei Gehalten von mehr als 40 vol.-% Acetonitril nur noch drei oxidative Maxima auftraten. Für alle Signale wurde eine Verschiebung zu höheren Potentialen und eine Erniedrigung der Peakströme beobachtet, einhergehend mit dem sinkenden Wassergehalt im Grundelektrolyten. Eine analoge Versuchsreihe wurde mit dem Britton-Robinson Puffer als Grundelektrolyt durchgeführt. Hierfür wurde eine wäßriger Kaliumphosphatpuffer (0,05 mol/L und pH 7) mit variierenden Anteilen Methanol gemischt. Hier fand der Übergang von vier zu drei Oxidationsstufen bei Methanolanteilen größer 10 vol.-% statt. Die beiden mittleren Signale, die hier zu beobachten waren, konnten durch eine Erhöhung der Konzentration des Quercetins (bis 100 $\mu\text{g/mL}$ im Grundelektrolyten) nicht besser hervorgehoben werden.

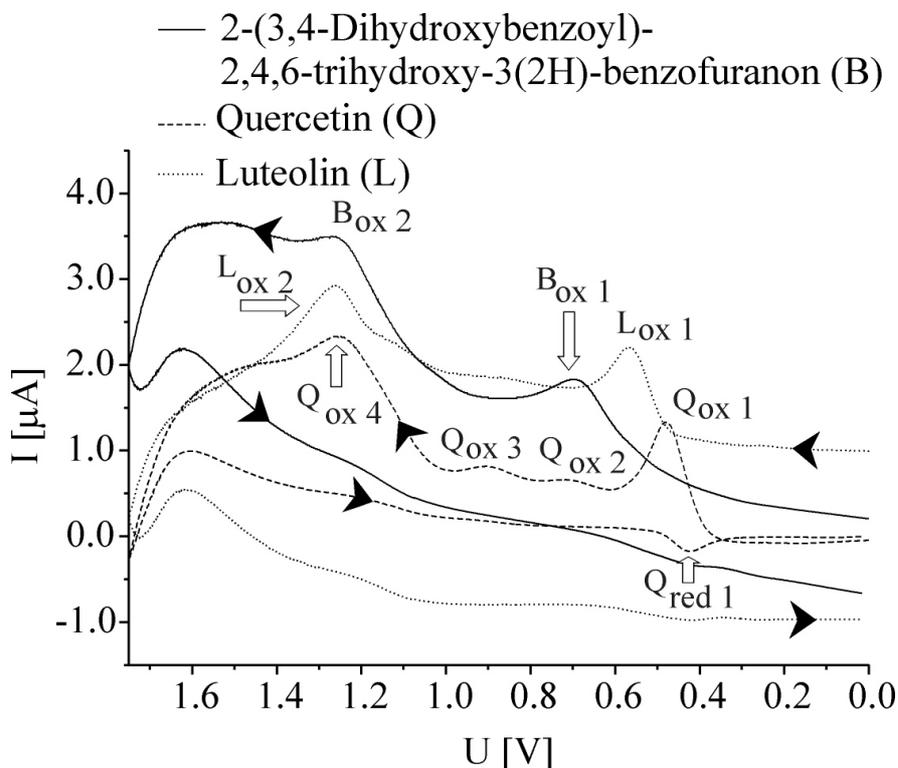


Abb. 4.31: Cyclovoltammogramme von Quercetin, Luteolin und dem Oxidationsprodukt des Quercetins mit jeweils $c = 20 \mu\text{g/mL}$, $dU/dt = 50 \text{ mV/s}$, Grundelektrolyt mit 20.- vol% wässriger Essigsäure (2 %) und 80.- vol% Acetonitril, Vorwärts- und Rückwärtsscan, alle Cyclovoltammogramme sind untergrundkorrigiert

Bei Messungen unter weitestgehendem Ausschluß von Wasser (da das Quercetin zwei Moleküle Kristallwasser pro Molekül Quercetin mit in die Lösung einbrachte, war das System nicht vollkommen wasserfrei) konnte an der Glaskohle-Elektrode in einem Potentialfenster von 0 V bis +1,75 V auch unter Variation der Spannungsvorschubsschwindigkeiten keine Oxidationsreaktion des Quercetins mehr nachgewiesen werden.

Als strukturverwandtes Flavonoid des Quercetins wurde das Luteolin cyclovoltammetrisch gemessen, sowie das Oxidationsprodukt des Quercetins (Abb. 4.31, die Abkürzung "ox" bedeutet oxidativer Peak, "red" steht für reduktiver Peak). Die Peakpotentiale der ersten Oxidationsstufe betragen +0,68 V (Oxidationsprodukt des Quercetins), +0,56 V (Luteolin) und +0,48 V (Quercetin). Die Wellen oberhalb von 1,4 V sind nicht interpretierbar, da dort bereits die Zersetzung des Elektrodenmaterials einsetzen kann.

In einer weiteren Meßserie wurden Cyclovoltammogramme von Cu^{2+} ($c = 4,2 \mu\text{g/mL}$), Quercetin ($20 \mu\text{g/mL}$) und von einem Gemisch beider Reaktionspartner, entsprechend einem Molverhältnis von 4 : 1, aufgenommen (Abb. 4.32). Bei der Herstellung des Reaktionsgemisches fiel die starke Rosafärbung auf, die sofort nach Zusammengeben der Reaktanden auftrat und die dann langsam abklang. Bei der Variation des Reaktionsmediums konnte

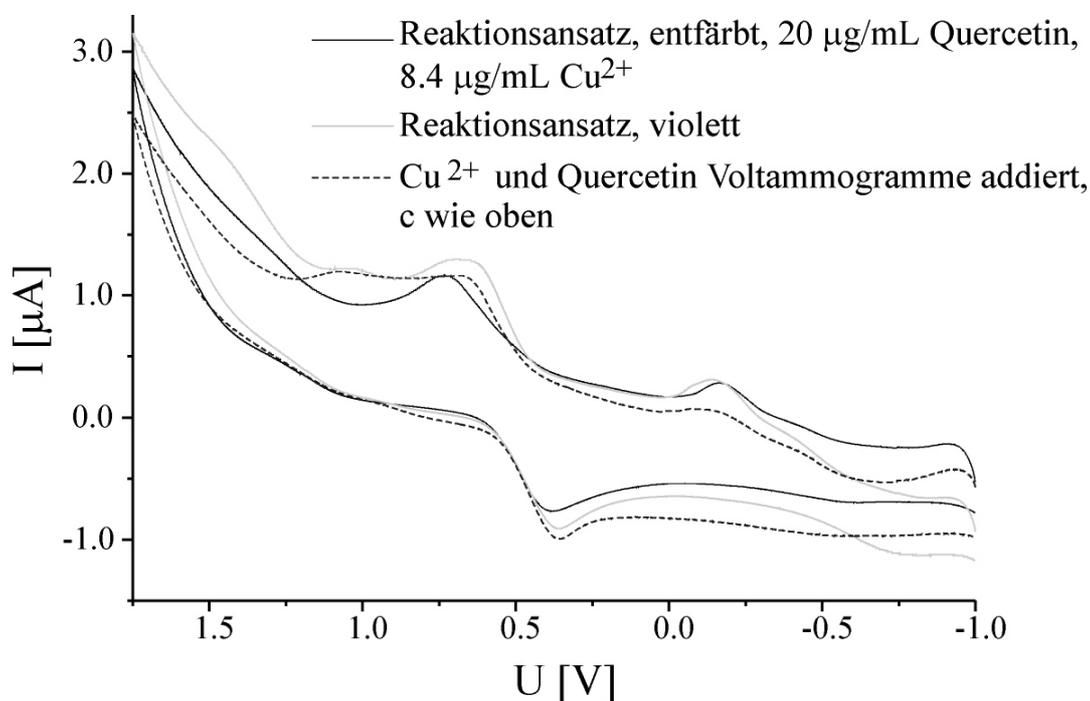


Abb. 4.32: Aus den Einzelmessungen durch Addition berechnete und gemessene (violetter und entfärbter Reaktionsansatz) Cyclovoltammogramme des Reaktionsgemisches, $dU/dt = 50 \text{ mV/s}$, $c_{\text{Acetonitril}} = 30 \text{ vol.-%}$, $c_{\text{Essigsäure 2 \%}} = 70 \text{ vol.-%}$

festgestellt werden, daß die Rosafärbung nur bei Anwesenheit von Acetonitril erzielt werden konnte. Wurde Acetonitril durch andere organische Solventien ersetzt, traten andere Färbungen auf (Methanol, Ethanol: Gelb) oder keine Färbungen (Essigsäureethylester). Es wurden Cyclovoltammogramme von einem intensiv rosa gefärbten und einem entfärbten Reaktionsgemisch aufgenommen. Das Cyclovoltammogramm der gefärbten Reaktionsmischung war deckungsgleich mit einem errechneten Cyclovoltammogramm, das durch Addition der Messungen von Quercetin und Cu^{2+} erhalten wurde. Ebenso war das Cyclovoltammogramm der entfärbten Lösung deckungsgleich mit einem errechneten Cyclovoltammogramm, das durch Addition der Messungen vom Oxidationsprodukt des Quercetins und Cu^{2+} erhalten wurde. Es wurden keine zusätzlichen Signale oder Peakverschiebungen festgestellt.

Cyclovoltammetrische Messung des Quercetins unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit

Abbildung 4.33 zeigt Voltammogramme einer Lösung mit $20 \mu\text{g/mL}$ Quercetin unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, werden die Vorwärtsscans in Abb. 4.33.a gezeigt und die Rückwärtsscans in Abb. 4.33.b. Die drei Oxidationsstufen des Quercetins waren bei der niedrigen Spannungsvorschubgeschwindigkeit von 25 mV/s zu erkennen (gekennzeichnet durch die drei Pfeile). Bei steigenden Spannungsvorschubgeschwindigkeiten bis zu 2 V/s war nur noch ein einziger sehr breiter Oxidationspeak zu beobachten, dessen Peakpotential sich zu höheren Werten verschob. Der Peakstrom stieg hierbei stark an.

Der reduktive Peak, der beim Rückwärtsscan auftrat, war nur bei Spannungsvorschubgeschwindigkeiten bis zu 50 mV/s zu erkennen (gekennzeichnet durch einen Pfeil).

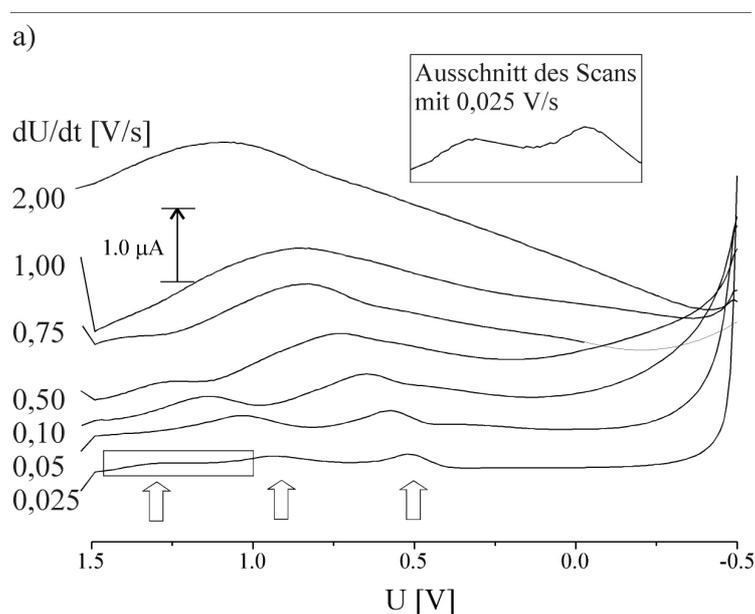


Abb. 4.33.a: Cyclovoltammogramme des Quercetins unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit dU/dt , hier Vorwärtsscan, Grundelektrolyt bestehend aus 30 vol.-% Acetonitril und 70 vol.-% wässriger Essigsäure (2 %)

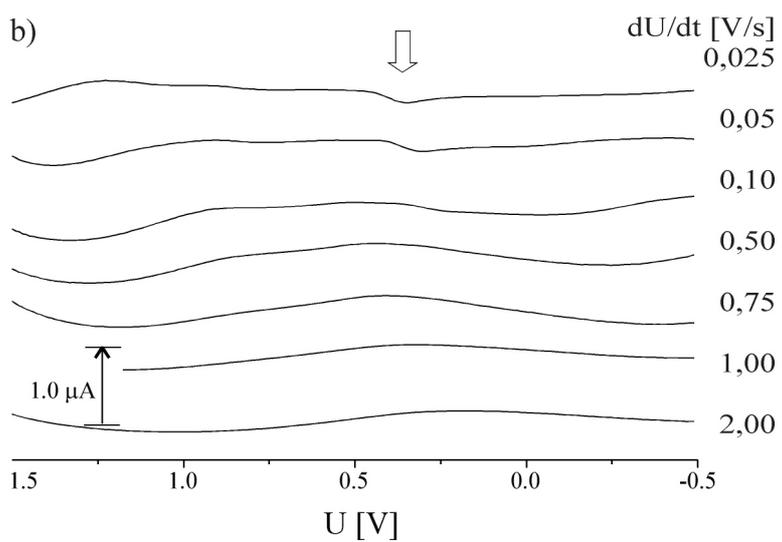


Abb. 4.33.b: Rückwärtsscan,
Bedingungen wie bei Abb.
4.32.a

4.2.3 Voltammetrische Messungen der Flavonoide in Kopplung mit der HPLC

Instrumentelles

Das chromatographische System basiert auf der Methode von Jungbluth [90]:

Analytische Säule: Nucleogel RP 100 5/250, 250 mm x 4 mm ID (Macherey Nagel, Düren)

Eluent: 70 vol.-% wäßrige Essigsäure (2 %)
30 vol.-% Acetonitril

Fluß: 0,7 mL/min

Probenschleife: 20 µL

Detektor 1: Knauer Variable Wavelength monitor; 293 nm

Dem Wellenlängendetektor wurde der elektrochemische Detektor bestehend aus einer Wall-Jet Zelle, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, und dem µAutolab (Eco Chemie, Utrecht). Die Arbeitselektrode war eine Glaskohle Elektrode ($\varnothing = 3$ mm), die Referenzelektrode war eine Ag/AgCl (3 mol/L KCl) Elektrode. Die voltammetrischen Messungen wurden im cyclovoltammetrischen und DC-Modus mit der Software GPES 4.4 (Eco Chemie) gesteuert.

On-line scannende DC Voltammetrie

Die elektrochemischen Parameter wurden wie folgt gewählt: $U_{start} = -0,5$ V; $U_{stop} = +1,5$ V; $U_{step} = 10,5$ mV; $dU/dt = 0,5$ V/s woraus sich eine maximal speicherbare Anzahl von 157 Scans ergab und eine Dauer des Meßprogrammes von 10,5 min. Hier wurde eine Reaktionsmischung, bestehend aus 20 µg/mL Quercetin und 4,2 µg/mL Cu^{2+} für die Messung

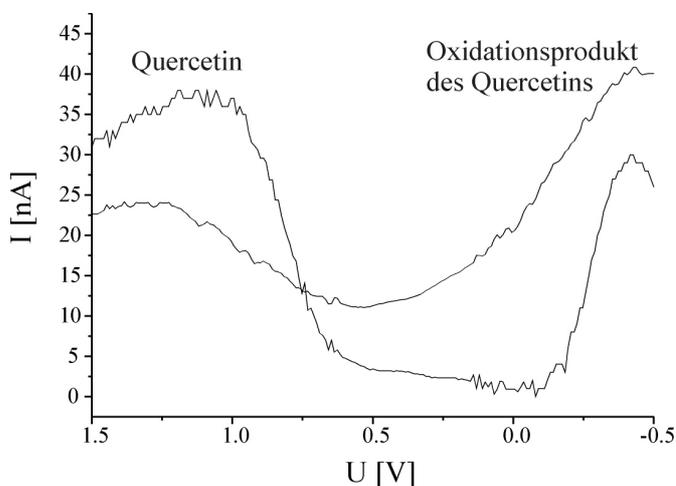


Abb. 4.34: On-line Cyclovoltammogramme von Quercetin und dem Oxidationsprodukt des Quercetins (2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon), $dU/dt = 0,5$ V/s

verwendet. Als Reaktionsmedium wurde der HPLC-Eluent eingesetzt und 20 μL der Lösung wurden direkt nach Zusammengabe der Reaktanden injiziert. Das Quercetin und das Benzofuranon als Oxidationsprodukt konnten mit der on-line scannenden Voltammetrie detektiert werden. Andere Verbindungen waren nicht nachweisbar. Abbildung 4.34 zeigt die untergrundkorrigierten on-line Voltammogramme des Quercetins und des Oxidationsproduktes. Es waren bei beiden Substanzen zwei breite oxidative Signale zu erkennen. Bestimmt man die Halbstufenpotentiale an den Wendepunkten der Stufen, ergeben sich für Quercetin die Potentiale -0,3 V und 0,8 V und für dessen Oxidationsprodukt die Potentiale -0,15 V und 0,9 V.

Multiinjektion zur Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme

Es wurden hydrodynamisch Voltammogramme in der Wall-Jet Zelle unter Variation der amperometrischen Detektorspannung bei jedem chromatographischen Lauf aufgenommen. Abbildung 4.35 zeigt die hydrodynamischen Voltammogramme für Quercetin und Kaempferol, sowie deren Oxidationsprodukte 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-(3(2H)-benzofuranon und 2-(4-Hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-(3(2H)-benzofuranon. Desweiteren wurde Luteolin zum Vergleich gemessen. Die Halbstufenpotentiale vs. Ag/AgCl betragen für Quercetin 0,70 V, für dessen Oxidationsprodukt 0,45 V und für das Oxidationsprodukt von Kaempferol 1,30 V.

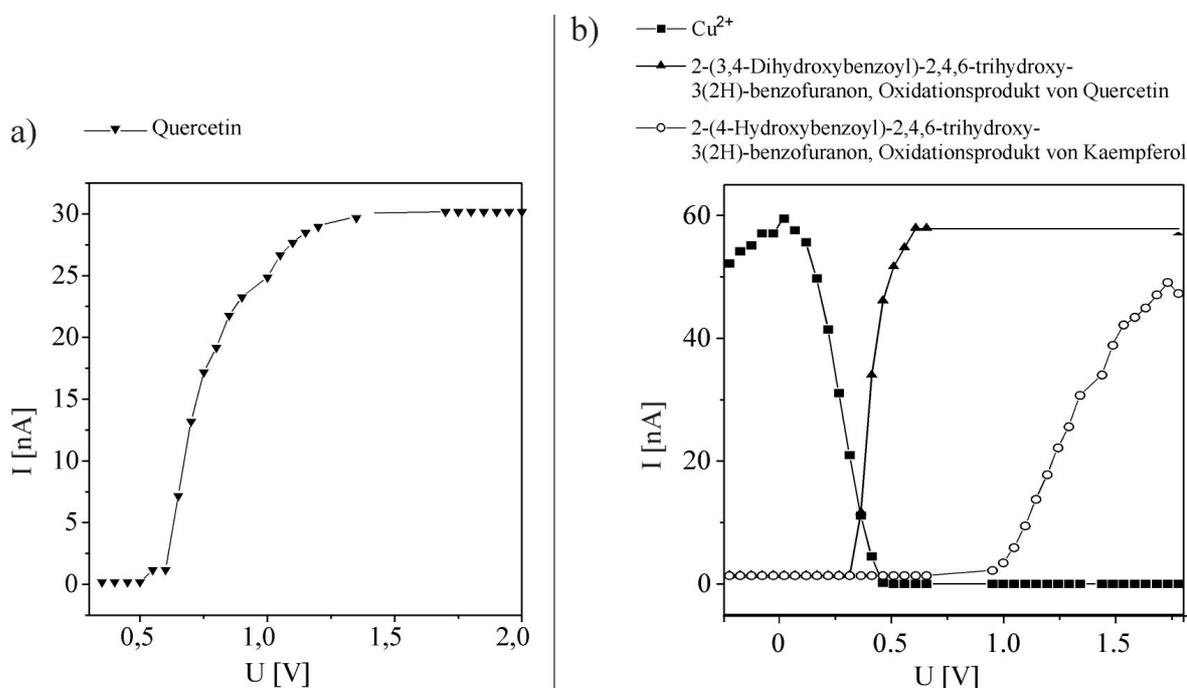


Abb. 4.35: Hydrodynamische Voltammogramme, aufgenommen nach der HPLC-Trennung unter Variation der Detektorspannung bei jeder Probeninjektion, $c = 20 \mu\text{g/mL}$

Fließinjektionsanalyse

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit in der Wall-Jet Detektorzelle auf die Form des Voltammogrammes von Quercetin untersucht. Es waren sehr niedrige Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten erforderlich, die Meßdauer pro Voltammogramm betrug bis zu 50 min. Um während der ganzen Meßdauer hinreichende Konzentrationen des Analyten in der Meßzelle aufrecht zu erhalten, wurde mit einer motorbetriebenen Spritze (B. Braun, Melsungen) eine Lösung von 40 $\mu\text{g/mL}$ Quercetin durch die Zelle gepumpt.

Das Voltammogramm, das bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und der sehr niedrigen Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 1 mV/s erhalten wird, zeigte ein breites, unspezifisches oxidatives Signal (Abb. 4.36). Man erkennt die Ähnlichkeiten zu Voltammogrammen im Batch bei sehr hoher Spannungsvorschubsgeschwindigkeit (2 V/s) oder zu den on-line Voltammogrammen (Abb. 4.33), die mit 0,5 V/s und einem Fluß von 0,7 mL/min aufgenommen worden waren. Bei sehr kleinen Flüssen bis zu 53 $\mu\text{L/min}$ verlagerte sich das Maximum zu niedrigeren Potentialen, es wurde schmaler und es zeichnete sich ein zweites Maximum ab.

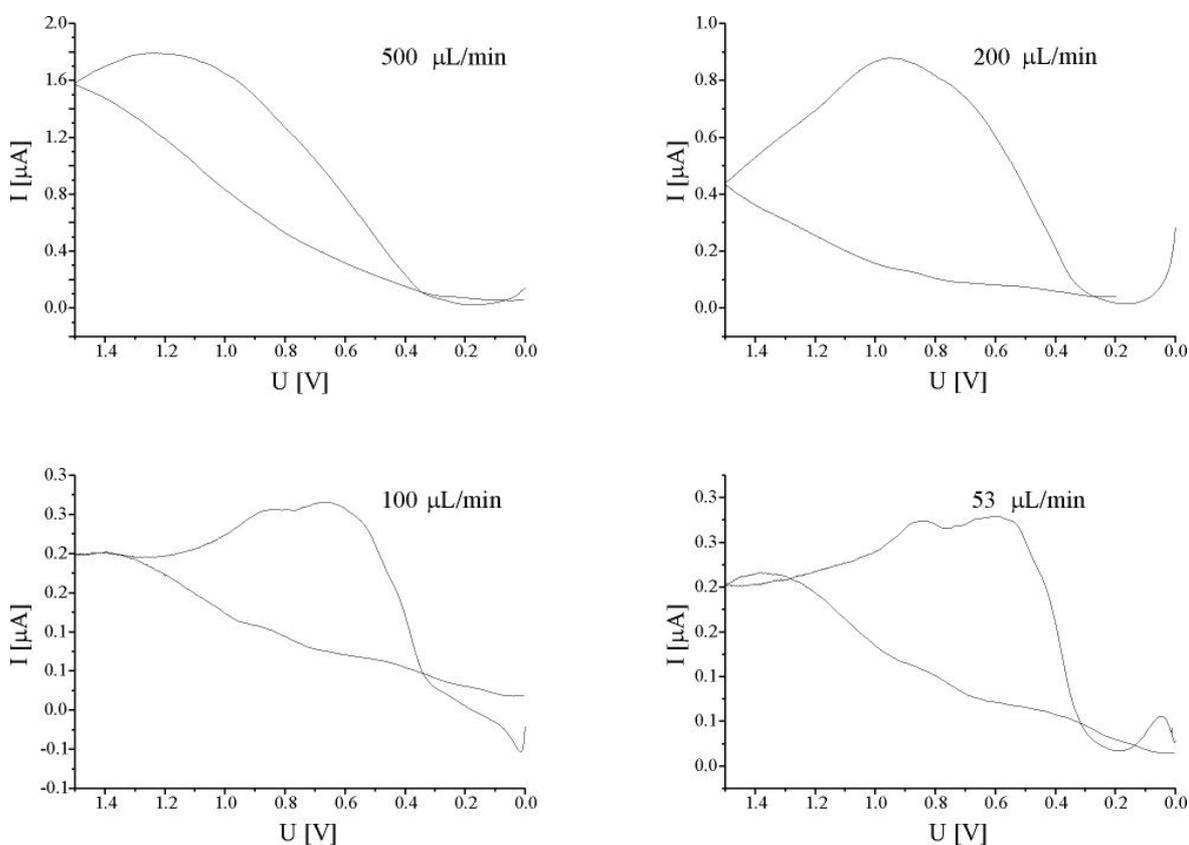


Abb. 4.36: Hydrodynamische cyclovoltammetrische Voltammogramme von Quercetin ($c = 40 \mu\text{g/mL}$), aufgenommen im fließenden System, bei unterschiedlichen

Stopped-Flow Messungen

In einem weiteren Versuch wurde in verschiedene Detektorzellen eine Lösung mit $40 \mu\text{g/mL}$ Quercetin im Eluenten injiziert und dann cyclovoltammetrisch mit einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 50 mV/s in ruhender Lösung gemessen. Dieser Versuch wurde mit der Wall-Jet Zelle und der herkömmlichen EFTA mit zwei verschiedenen Durchmesser des Fließkanals (Kanalplatte für GC Elektroden und Kanalplatte für die HMDE) durchgeführt. Es konnte hierbei kein Effekt der Zellenarchitektur auf die Stromverläufe der elektrochemischen Messung festgestellt werden.

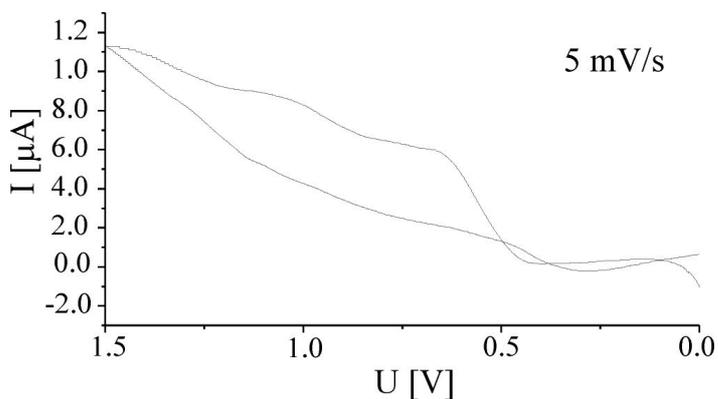
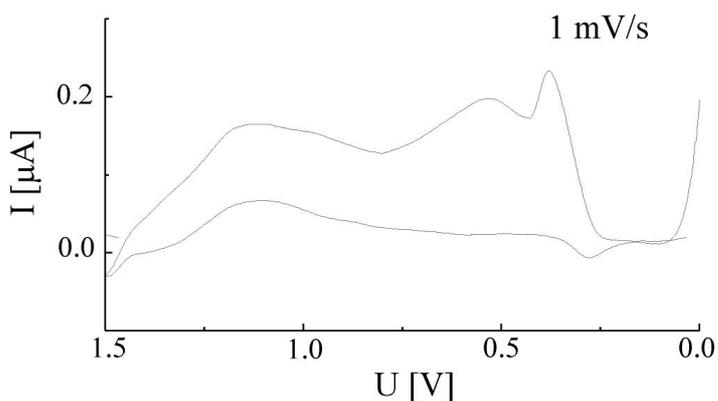
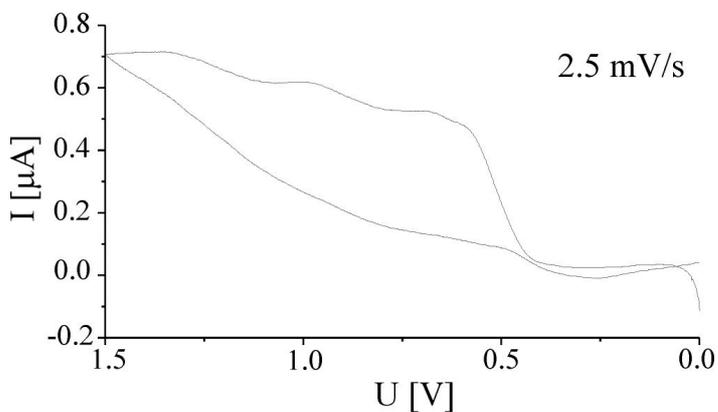


Abb. 4.37: Voltammogramme von Quercetin ($c = 40 \mu\text{g/mL}$) in ruhender Lösung, aufgenommen in der Wall-Jet Zelle unter Variation der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit



Für die Messungen nach der HPLC-Trennung bei sehr langsamen Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten wurde die Quercetinlösung ebenfalls direkt in die Wall-Jet Zelle injiziert. Die Cyclovoltammogramme wurden dann in ruhender Lösung in der Wall-Jet Zelle aufgenommen. Abbildung 4.37 zeigt die Voltammogramme bei unterschiedlichen Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten. Hier ist deutlich zu erkennen, daß die drei Oxidationsstufen deutlicher hervortraten, je geringer die Spannungsvorschubsgeschwindigkeit war und die ehemals stufenförmigen Signale zunehmend peakförmig wurden. Unter den optimalen Bedingungen (ruhende Lösung, Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 1 mV/s) wurden Cyclovoltammogramme erhalten, die drei Oxidationsstufen bei + 0,35 V, + 0,55 V und +1,15 V zeigten. Die erste Oxidationsstufe war unter diesen Bedingungen reversibel. Mit Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten unter 1 V/s konnten keine auswertbaren Cyclovoltammogramme erhalten werden. Messungen in der Wall-Jet Zelle, die länger als 50 min dauerten, unterlagen starken temporären Stromschwankungen. Für die cyclovoltammetrische Detektion in ruhender Lösung war eine Analytkonzentration von 40 µg/mL notwendig.

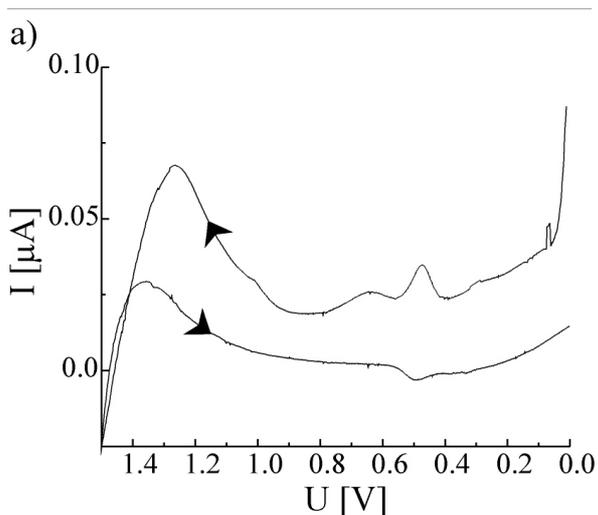
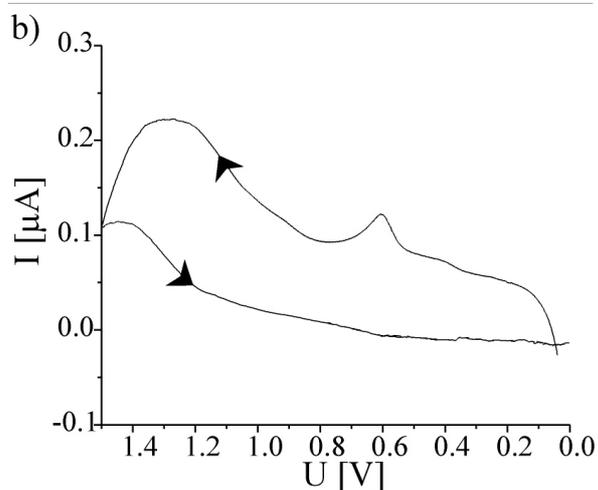


Abb. 4.38: Voltammogramme von Quercetin (4.38.a) und dessen Oxidationsprodukt (4.38.b) aufgenommen nach der HPLC-Trennung eines Gemisches ($c = 100 \mu\text{g/mL}$) im Stopped-Flow Modus in der Wall-Jet Zelle, $dU/dt = 1 \text{ mV/s}$



Die Messungen wurden dann im Stopped-Flow Modus durchgeführt. In Abbildung 4.36 sind die Stopped-Flow Cyclovoltammogramme nach einer HPLC Trennung von Quercetin und dessen Oxidationsprodukt Dihydroxybenzoyltrihydroxibenzofuranon in einer Konzentration von je 100 $\mu\text{g/mL}$ zu sehen. Die Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ war mindestens nötig, um die Analyten cyclovoltammetrisch detektieren zu können. Die oxidativen Peakpotentiale betrugen für Quercetin +0,48 V, +0,62 V und +1,21 V und für dessen Oxidationsprodukt +0,60 V und 1,28 V vs. Ag/AgCl, 3 mol/L KCl. Die Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt, um die Nachvollziehbarkeit gewährleisten zu können. Die Methode wurde weiterhin dadurch abgesichert, daß eine kontinuierliche Anpassung der Parameter zu den hier gewählten Versuchsbedingungen geführt hatte.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Vorversuche mit Flavonoiden im Batch

Quercetin wurde als bekannter Vertreter der Flavonoide cyclovoltammetrisch untersucht. Dabei trat ein zusätzliches oxidatives Signal auf, das nicht im Einklang stand mit den drei bisher in der Literatur beschriebenen oxidativen Maxima [105, 109]. Bei der geringen Intensität der beiden mittleren oxidativen Peaks stellte sich die Frage nach der Signifikanz und Interpretierbarkeit der Signale. Die zweite oxidative Stufe des Quercetins - die laut Literaturangaben nach dem ersten sehr ausgeprägten erschien - hat jedoch eine ebenso geringe Intensität wie der hier gefundene, zusätzliche Peak. Da die beiden mittleren oxidativen Peaks bei +0,70 V und +0,90 V sehr kleine Ströme aufwiesen, wurden weitere Messungen unter Variation der Versuchsparameter (Elektrolytzusammensetzung und Spannungsvorschubgeschwindigkeit) vorgenommen. In diesen Versuchsreihen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anteil protische Solventien im Grundelektrolyten und dem Auftreten des zusätzlichen Signals gefunden werden. Bei hohen Gehalten von Wasser im Grundelektrolyten trat das vierte Maximum auf, bei hohen Gehalten organischer Solventien (40 vol.-% Acetonitril) waren nur drei oxidative Signale zu beobachten. Zusätzlich wurde Britton-Robinson Puffer (wäßriger Kaliumphosphatpuffer (0,05 mol/L und pH 7) mit variierenden Anteilen Methanol) eingesetzt, um ausschließen zu können, daß das zusätzliche Signal im Zusammenhang mit den Komponenten des HPLC-Eluenten (wäßrige Essigsäure und Acetonitril) stand, der zunächst als Grundelektrolyt eingesetzt worden war. Hier ergab sich eine ähnliche Beobachtung: Der Übergang von vier zu drei Signalen fand bei Methanolgehalten von mehr als 10 vol.-% statt.

Da Methanol als protischer Solvent polarer als Acetonitril ist, muß dessen Anteil in einem Gemisch mit Wasser höher sein, um die gleiche Polarität eines Acetonitril - Wasser - Gemisches zu erreichen. Hieraus ist abzuleiten, daß die Polarität des Grundelektrolyten einen Einfluß auf den Verlauf der elektrochemischen Reaktion hatte. Aus den Beobachtungen ergeben sich zwei Fragen:

- Welcher Funktionalität im Quercetin-Molekül kann die zusätzliche Oxidationsstufe zugeordnet werden?
- Wie läßt sich der Einfluß der Polarität des Grundelektrolyten auf den Verlauf der elektrochemischen Reaktion erklären?

Bei niedrigen Gehalten protischer Solventien besteht bevorzugt die Möglichkeit einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe an C-5 und der Keto-Gruppe an C-4 und zwischen der OH-Gruppe an C-3 und der Keto-Gruppe an C-4. Dies wäre

zu erklären, wenn die beiden OH-Gruppen an C-3 und C-5 dem mittleren der drei Oxidationssignale zugeordnet werden. Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen werden bevorzugt dann gebildet, wenn die Konzentration des protischen Solvents hoch ist. Die Tabelle 4.11 bietet einen Überblick über die Signalzuordnungen, die aus der Literatur entnommen wurden und die vorgeschlagenen Zuordnungen für polare und unpolare Solventien.

Tabelle 4.11: Zuordnungen oxidativer Signale des Quercetins zu den OH-Gruppen

$\sim E_{\text{ox}}$ [V]	+ 0,48	+ 0,70	+ 0,90	+ 1,25
Literatur [105]	C-3' und C-4'	C-3		C-5 und C-7
experimentell unpolar	C-3' und C-4'	C-3 und C-5		C-7
experimentell polar	C-3' und C-4'	C-3	C-5	C-7

Die neue Zuordnung der Signale des Quercetins läßt sich theoretisch mit einer vergleichenden Messung überprüfen. Hierfür sollte ein Flavonoid cyclovoltammetrisch untersucht werden, das mindestens an C-5 und C-7 OH-Gruppen trägt. Z. B. sollte Luteolin demnach bei polaren und unpolaren Grundelektrolyten immer drei oxidative Signale zeigen. Es konnte kein drittes Signal nachgewiesen werden. Hier stößt die Methode, Signale über Cyclovoltammogramme strukturverwandter Verbindungen zuzuweisen, an ihre Grenzen. Als Perspektive und eindeutige Methode für die Zuordnung ist die präparative elektrochemische Herstellung der Produkte zu sehen. Diese Synthese kann mit coulometrischen Durchflußelektrolysezellen bewerkstelligt werden [129]. Mit der Synthese geht die Bestimmung der Elektronenzahlen einher, diese erlaubt gesicherte Rückschlüsse auf die Redoxvorgänge. Die Produkte müßten dann für eine Strukturaufklärung mit spektroskopischen Methoden isoliert werden.

Mit dieser Arbeit konnten die ersten cyclovoltammetrischen Messungen an dem Oxidationsprodukt von Quercetin präsentiert werden. Hier sei der Vergleich der Peakpotentiale der ersten Oxidationsstufe gegeben:

$$+0,68 \text{ V (Oxidationsprodukt des Quercetins)} > +0,56 \text{ V (Luteolin)} > +0,48 \text{ V (Quercetin)}$$

Das Peakpotential läßt eine Aussage zu, wie leicht die Substanz oxidiert werden kann. Herrscht im Aromaten eine hohe Elektronendichte, sollte das Phenol bei niedrigen Potentialen oxidiert werden können. Dieser Zusammenhang wird hier von den Beobachtungen bestätigt. Man betrachtet das bicyclische System der drei hier behandelten Verbindungen als

Substituent des Benzoylringes, der zuerst - bei den geringsten Peakpotentialen - oxidiert wird. Die Einordnung des Substituenten nach sinkendem elektronenziehenden Effekt ergibt:

Oxidationsprodukt des Quercetins > Luteolin > Quercetin

Die cyclovoltammetrischen Messungen des Reaktionssystems aus Cu^{2+} und Quercetin zeigten keine Änderungen gegenüber aus den Einzelkomponenten errechneten Cyclovoltammogrammen. Damit konnten aus den elektrochemischen Messungen keine weitergehenden Informationen insbesondere über das rosa gefärbte Intermediat gewonnen werden.

Die Messungen des Quercetins unter Variation der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit standen vor allem unter dem Aspekt, Änderungen in der Reaktionskinetik erkennen zu können. Im Batch konnten die drei (vier) Oxidationsstufen nur bei niedrigen Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten bis maximal 50 mV/s beobachtet werden. Bei hohen Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten liefen die angekoppelten chemischen Reaktionen im untergeordneten Maß ab, da die Reaktionsgeschwindigkeit gering im Gegensatz zur Zeitskala des elektrochemischen Experiments war. Ebenso nimmt die Reversibilität der ersten Oxidationsstufe mit zunehmender Spannungsvorschubsgeschwindigkeit ab, auch hier ist die Kinetik der Reaktion langsam bezüglich der Zeitskala des elektrochemischen Experimentes. Die Zunahme des Peakstromes mit steigender Spannungsvorschubsgeschwindigkeit stimmt mit den theoretischen Erkenntnissen überein. Insgesamt war die Peakform mit zunehmender Spannungsvorschubsgeschwindigkeit sehr breit (ca. 1 V) und erstreckte sich beinahe über das gesamte Potentialfenster. Peaks mit so großen Basisbreiten sind wenig selektiv und für eine qualitative Zuordnung unbrauchbar. Dies ist ein wichtiger Kritikpunkt, wenn die hohen Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten auf die Durchflußanalytik übertragen werden sollen.

Die Entwicklung der Stopped-Flow Methode

Quercetin und dessen Oxidationsprodukt konnten on-line mit DC Voltammetrie nach der HPLC Trennung detektiert werden. Mit einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von 0,5 V/s wurden hydrodynamische Voltammogramme gewonnen, die wenig Ähnlichkeiten mit den Messungen im Batch aufwiesen. Die Anwendung der Multiinjektion zur Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme unter Variation der amperometrischen Detektorspannung lieferte weitestgehend S-förmige Stromkurven mit je einem Wendepunkt, aus denen das Halbstufenpotential abgelesen werden konnte. Da die Ergebnisse aus den Durchflußmessungen nicht mit den Batch-Messungen korreliert werden konnten, wurden Experimente mit dem Ziel durchgeführt, das sehr spezifische elektrochemische Verhalten des Quercetins und verwandter Substanzen auch in der HPLC-Detektion nutzen zu können.

Zunächst wurde der Einfluß der Konvektion auf die Funktion $I = f(U)$ am Beispiel des Quercetins untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, daß schon bei geringster Flußgeschwindigkeit von $53 \mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von $1 \text{ mV}/\text{s}$ nur noch zwei Maxima im Cyclovoltammogramm erschienen und keine Reversibilität der ersten Oxidationsstufe zu erkennen war. Mit zunehmender Flußgeschwindigkeit war nur noch ein einziges, ca. 1 V breites Signal zu erkennen. Daraus wurde geschlossen, daß Voltammogramme in der Wall-Jet Zelle nur in ruhender Lösung erhalten werden konnten. In einem weiteren Versuch wurden die Cyclovoltammogramme in ruhender Lösung in der Wall-Jet Zelle unter Variation der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit aufgenommen. In ruhender Lösung wurden von Quercetin Cyclovoltammogramme mit einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von $1 \text{ mV}/\text{s}$ aufgenommen, die drei Oxidationsstufen zeigten. Die erste Oxidationsstufe war unter diesen Bedingungen reversibel. Bei steigender Spannungsvorschubsgeschwindigkeit in ruhender Lösung nahmen alle oxidativen Signale eine Stufenform an, analog zu den Beobachtungen im Batch. Eine Reversibilität der ersten Stufe konnte bei einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit von $2,5 \text{ mV}/\text{s}$ nicht mehr erkannt werden. Auch diese Abhängigkeit der Reversibilität von der Spannungsvorschubsgeschwindigkeit spiegelte die Beobachtungen der Messungen im Batch wieder.

Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu den Resultaten, die Gunasingham und Mitarbeiter erzielt hatten [21]. Bei einer Flußgeschwindigkeit von $1,0 \text{ mL}/\text{min}$ und Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten bis zu $2 \text{ V}/\text{s}$ konnten die einzelnen Reduktionsstufen von Benzochinon selektiv detektiert werden. Bei der Diskussion ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Kinetik und die Reaktionspfade der Oxidation von Quercetin und der Reduktion von Chinonen nicht vergleichbar sind. Auch die Rahmenbedingungen (Zellvolumen und Polarität des Grundelektrolyten) unterscheiden sich und führen deshalb zu unterschiedlichem elektrochemischen Verhalten. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Parameter - Spannungsvorschubsgeschwindigkeit und Flußgeschwindigkeit - immer an die jeweiligen Rahmenbedingungen angepaßt werden müssen.

Die Parameter, die für die selektive Detektion von Quercetin in wäßrigen Medien und in einer kleinvolumigen Wall-Jet Zelle eingehalten werden mußten, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Messung in ruhender Lösung
- Sehr kleine Spannungsvorschubsgeschwindigkeiten (optimal: $1 \text{ mV}/\text{s}$)

Diese Bedingungen konnten gut im Stopped-Flow Modus nach einer HPLC-Trennung realisiert werden. Für die Anwendung dieser Technik wurde ein Gemisch aus Quercetin und

dessen Oxidationsprodukt mit der HPLC getrennt und beide Analyten wurden im Stopped-Flow Modus cyclovoltammetrisch mit einer Spannungsvorschubsgeschwindigkeit detektiert. Während bei der Fließinjektionsanalyse die Lösung direkt in die Zelle eingebracht worden war und eine Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$ benötigt wurde, mußte im Stopped-Flow Modus eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt werden. Quercetin und dessen Oxidationsprodukt wurden mit der Stopped-Flow Methode nach deren HPLC-Trennung detektiert.

Vergleich der Methoden

Um einen Vergleich unterschiedlicher elektrochemischer Detektionsmethoden am Beispiel der Flavonoide leisten zu können, sei mit Tabelle 4.11 eine Aufstellung der Peakströme des Quercetins bei definierten Konzentrationen gegeben.

Tabelle 4.12: Potentiale der oxidative Peaks ($E_{1/2}$), Peakströme (I_p) und Anzahl der oxidativen Stufen (n) des Quercetins mit verschiedenen elektrochemischen Detektionsmethoden (bei mehreren Peaks beziehen sich die Daten auf das erste Maximum)

Kapitel	Seite	Methode	c [$\mu\text{g/mL}$]	$E_{1/2}$ [V]	I_p [nA]	n
4.2.2	100	Batch, CV, 50 mV/s	20	0,48	1,27	3-4
4.2.3	106	HPLC-ECD, amperometrisch, Variation der Detektorspannung bei jeder Injektion	20	0,7	0,031	1
4.2.3	108-109	Fließinjektionsanalyse und Stopped-Flow Modus	40	0,35	0,15	3
4.2.3	110	HPLC-CV im Stopped-Flow Modus	100	0,48	0,0125	3
		Literaturdaten:				
3.4.2	38	Batch, CV, 50 mV/s	[105] ?	0,083	?	3
		Batch, CV, 50 mV/s	[109] 1,7	0,28	0,45	2-3

Generell zeigen die Daten aus Tabelle 4.12 die Variation des elektrochemischen Verhaltens des Quercetins unter verschiedenen Versuchsbedingungen und die Abweichung der in dieser Arbeit ermittelten Daten von Informationen aus der Literatur. Wie schon aus dem Kapitel 4.2 hervorging, können Halbstufenpotentiale nicht übertragen werden sondern müssen unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen ermittelt werden. Auffällig ist die Abweichung zwischen den cyclovoltammetrischen Messungen im Stopped-Flow Modus, die einmal mit Fließinjektion und zum anderen in Kopplung mit der HPLC durchgeführt wurden. Dieser Unterschied geht auch aus den Abbildungen 4.3.7 und 4.3.8 hervor. Die cyclovoltammetrischen Messungen in Kopplung mit der HPLC stimmen wiederum gut mit den

Messungen aus dem Batch überein. Mit der amperometrischen Detektion und der Variation der Detektorspannung bei jeder Probeninjektion ließ sich nur eine Stufe nachweisen (Abb. 4.35, S. 106). Das Halbstufenpotential von +0,7 V für Quercetin, das mit dieser Methode ermittelt wurde, liegt über dem ersten Oxidationspotential, das mit Cyclovoltammetrie detektiert. Mit der Kopplung von HPLC und Cyclovoltammetrie können demnach für die elektrochemische Charakterisierung redoxaktiver Verbindungen gewonnen werden, die mit der hydrodynamischen Voltammetrie unter Variation der amperometrischen Detektorspannung nicht zugänglich ist.

Ausblick

Damit kann eine elektrochemische Methode für die HPLC-Detektion präsentiert werden, die es erlaubt, das spezifische elektrochemische Verhalten redoxaktiver Verbindungen für die elektrochemische HPLC Detektion zu nutzen. Bisher sind nur sehr wenige Applikationen von Cyclovoltammetrie in Verbindung mit der HPLC bekannt (Kap. 3.2.2, S. 19) und diese Lücke kann mit der hier vorgestellten Methode unter Verwendung gängiger instrumenteller Komponenten geschlossen werden. Ein Anwendungsgebiet ist in der Untersuchung von Elektrolyseprodukten aus der elektroanalytischen Elektrolyse - die im Gemisch vorliegen - zu sehen. Die Stopped-Flow Detektionsmethode hat ein rein qualitatives Aussagevermögen, da die einzusetzenden Konzentrationen der Analyten sehr hoch sind. Bei cyclovoltammetrischen Methoden werden immer hohe Konzentrationen verlangt [3-6, 12] und bei der hier vorgestellten Methode unterliegt die Lösung zusätzlich einer Verdünnung im chromatographischen System. Bei der präparativen Elektrolyse stehen die benötigten Konzentrationen zur Verfügung [129].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die on-line scannende Voltammetrie als elektrochemische Detektionsmethode in der HPLC wurde am Beispiel der Herbizide Diquat, Paraquat und Difenzoquat mit Ethylparaquat als interner Standard demonstriert. Die flüssigchromatographische Trennung wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert, so daß hier die vier quaternären Ammoniumverbindungen erstmals innerhalb eines Chromatogrammes und unter Verwendung eines isokratischen Elutionssystems getrennt werden konnten. Bisher bekannte elektrochemische Methoden im Batch oder mit Fließinjektionsanalyse für diese Analyten sind zwar teilweise sehr nachweisstark und empfindlich (mit Nachweisgrenzen von 0,31 ng für DQ und 0,41 ng für PQ), DQ und PQ und EQ überlappen jedoch voltammetrisch, da die Halbstufenpotentiale maximal um 100 mV differieren. Eine parallele Analyse dieser Analyten war mit elektrochemischen Methoden bisher nicht möglich. Die hier vorgestellte Kopplung der Voltammetrie mit der HPLC ermöglichte die parallele elektrochemische Analyse der drei Herbizide mit einem chromatographischen Lauf. Aus den hydrodynamischen Voltammogrammen gingen die Halbstufenpotentiale hervor. Die Entwicklung geschah unter dem Einsatz der zum Potentiostaten zugehörigen Steuerungssoftware, für die mit den scannenden Detektionsmethoden ein neuer Anwendungsbereich erschlossen wurde. Die absoluten Nachweisgrenzen für die on-line scannende Voltammetrie betragen 8 ng für DQ, 26 ng für PQ, 22 ng für EQ und 16 ng für DF. Damit konnten die Herbizide mit scannender Voltammetrie bei gleichen Nachweisstärke wie mit der literaturbekannten amperometrischen Methode detektiert werden. Für die Quantifizierung der Analyten mit dieser Methode traten jedoch hohe Standardabweichungen auf (bis zu 13 % relative Standardabweichung). Die Ursache für diese Streuungen konnte mit mehreren Versuchen unter Variation der Versuchsparameter und -bedingungen nicht lokalisiert werden.

Für die Analytik der Herbizide wurden Arbeitsspannungen von bis zu -1,8 V an die hängende Quecksilbertropfenelektrode angelegt. Hierfür wurde das Zelldesign eines Electrochemical Flow-Through Trace Analyzers (EFTA) (Metrohm, Herisau) optimiert. Mit einem Anströmwinkel von 135° bezüglich der Glaskapillare und der Verwendung von silanisierten Glaskapillaren konnte die Stabilität der HMDE erheblich gesteigert werden. Somit erschloß sich ein Potentialfenster, das bisher in der Durchflußanalytik stark problembehaftet war, da die bei Potentialen unter -1,4 V einsetzende Wasserstoffabscheidung die Stabilisierung des Tropfens erschwerte. Diese instrumentellen Verbesserungen machten die Anwendung der HMDE in einer kleinvolumigen Durchflußzelle erst möglich.

Für ein amperometrisches Monitoring mit HPLC-ECD im reduktiven Bereich, wie es in der Naturstoffanalytik angewendet werden soll, wurde eine leicht praktikable Lösung unter

Verwendung instrumenteller Komponenten vorgestellt, die in den meisten naturstoffanalytischen Laboratorien bereits zur Verfügung stehen. Hier kam die Quecksilberfilmelektrode zum Einsatz, mit der DQ, PQ und EQ bis zu einem Potential von -0,8 V detektiert wurden. Der Quecksilberfilm wurde on-line in einer Wall-Jet Zelle hergestellt und ist mehrere Tage beständig. Durch die Abscheidung elementaren Quecksilbers auf dem Glaskohle Träger wurde der Untergrundstrom so stark gesenkt, daß eine Messung in dem Potentialbereich möglich war. Allerdings waren auch hier die Messungen mit hohen Standardabweichungen behaftet (bis zu 17 % relative Standardabweichung).

Mit den hier präsentierten Methoden erschließt sich die Möglichkeit, das aus der Polarographie bekannte elektrochemische Verhalten von reduzierbaren Verbindungen, die im Gemisch vorliegen und deren voltammetrische Signale überlappen, für deren Detektion und Untersuchung zu nutzen.

In einem weiteren Abschnitt wurde eine Methode vorgestellt, mit der cyclovoltammetrische Messungen im Stopped-Flow Modus nach einer HPLC-Trennung durchgeführt werden konnten. Die meßtechnischen Parameter (Flußgeschwindigkeit und Spannungsvorschubgeschwindigkeit) wurden so optimiert, daß das spezifische voltammetrische Verhalten von Quercetin und dessen Oxidationsprodukt von Batch-Messungen auf eine Wall-Jet Detektorzelle übertragen wurde. Bisher war eine elektrochemische Charakterisierung dieser Verbindungen in Kopplung mit der HPLC nicht möglich. Mit der hier durchgeführten Methodenoptimierung und einem Vergleich mit einer literaturbekannten Kopplung von Cyclovoltammetrie mit der HPLC, konnte gezeigt werden, daß die meßtechnischen Parameter an die Rahmenbedingungen des Versuchs (Zellarchitektur und Art des zu untersuchenden Redoxsystems) angepaßt werden müssen. Mit der Stopped-Flow Methode sind redoxaktive Substanzen, die als Gemisch in wäßriger Lösung vorliegen, durch die Kopplung der HPLC-Trennung und Cyclovoltammetrie elektrochemisch in einer kleinvolumigen Wall-Jet Zelle charakterisierbar.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Osteryoung, J.; Osteryoung, R.A.: "*Square wave voltammetry*" Anal. Chem. 57, 1 (1985) 101 A-110A
- 2 Ternes, W.: "*Beiträge zur Weiterentwicklung der elektrochemischen Detektion und der Gelchromatographie in wässrigen Systemen zur Anwendung bei der Spurenanalyse hydrophiler Wirkstoffe*" Dissertation 1985, Universität Hannover
- 3 Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O.: "*Electrochemistry: principles, methods and applications*" Oxford University Press, Oxford, 1993
- 4 Kissinger, P.T.; Heineman, W.R.: "*Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*" Marcel Dekker, New York, 1984
- 5 Bard, A.J.; Faulkner, L.R.: "*Electrochemical methods: fundamentals and applications*" Jon Wiley & Sons, New York, 1980
- 6 Geckeler, K.E.; Eckstein, H., Speiser, B.: "*Biochemische Labormethoden - Elektroanalytische Methoden*" Vieweg, Wiesbaden, 1998
- 7 Buettner, G.: "*The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate*" Arch. Biochem. Biophys. 300, 2 (1993) 535-543
- 8 van Acker, S.A.B.E.; Koymans, L.M.H.; Bast, A.: "*Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity*" Free Rad. Biol Med. 15 (1993) 311-328
- 9 Gutz, I.G.R.; Angnes, L.; Pedrotti, J.J.: "*Adaption of poly(tetrafluorethylene) tips to mercury drop electrodes and evaluation by flow injection analysis*" Anal. Chem. 65 (1993) 500-503
- 10 Geißler, M.: "*Polarographische Analyse*" Verlag Chemie, Weinheim, 1981
- 11 Osteryoung, J.: "*Voltammetry for the future*" Acc. Chem. Res 26, 3 (1993) 77-83
- 12 Gosser, D.K.: "*Cyclic voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms*" VCH, New York, 1993

- 13 Vanhumbecq, J.B.: *“Zyklische Voltammetrie”* DGO Arbeitsblattserie Analyseverfahren, Deutsche Gesellschaft für Galvano- und Oberflächenanalytik e.V., Düsseldorf, 1986
- 14 Ternes, W.; Gronemeyer, M; Schwarz, K.: *“Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol and carvacrol in different foodstuffs”* Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1995) 544-547
- 15 Takano, B.; McKibben, M.A.; Barnes, H.L.: *“Liquid chromatographic separation and polarographic determination of aqueous polythionates and thiosulfates”* Anal. Chem. 56 (1984) 1594-1600
- 16 Dr. Ing. Herbert Knauer Wissenschaftlicher Gerätebau: *“Benutzerhandbuch-Eurochrom 2000 Basic Edition”* Berlin (1996) S. 57
- 17 Caudill, W.L.; Ewing, A.G.; Jones, S.; Wightman, R.M.: *“Liquid chromatography with rapid scanning electrochemical detection at carbon electrodes”* Anal. Chem. (1983) 55, 1877-1881
- 18 Lunte, C.E.; Wheeler, J.F.; Heineman, W.R.: *“Voltammetric / amperometric detection for liquid chromatography“* Anal. Chim. Acta 200 (1987) 101-114
- 19 Lunte, C.E.; Wheeler, J.F.; Heineman, W.R.: *“Determination of selected phenolic acids in beer extract by liquid chromatography with voltammetric-amperometric detection”* Analyst 113 (1988) 95-98
- 20 Lunte, S.E.: *“Voltammetric detection for LC“* LC-GC 7,6 (1989) 492-498
- 21 Gunasingham, H.; Tay, B.T.; Ang, K.P.: *“Computer-assisted rapid-scan cyclic staircase voltammetry in normal-phase high-performance liquid chromatography”* Anal. Chem. 59 (1987) 262-266
- 22 Ploegmakers, H.H.J.L.; Moritz, R.A.; Toll, R.J.M.M.; van Oort, W.J.: *“Computerized dynamic voltammetric detection after HPLC of antineoplastic agents etoposide, teniposide, adriamycin and its metabolite adriamycinol in urine samples“* J. Automatic Chemistry 11, 3 (1989) 106-112
- 23 Ploegmakers, H.H.J.L.; van Oort, W.J.: *“Computerized dynamic voltammetric detection in HPLC“* Analytical Instrumentation 16, 4 (1987) 467-468

- 24 Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O.; Mitoseriu, L.C.: "*Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis*" Anal. Chem. 66 (1994) 3145-3150
- 25 Elbicki, J.M.; Morgan, D.M.; Weber, S.G.: "*Theoretical and practical limitations on the optimization of amperometric detectors*" Anal. Chem. 56 (1984) 978-985
- 26 Samuelsson, R.; O'Dea, J.; Osteryoung, J.: "*Rapid scan square wave voltammetric detector for HPLC*" Anal. Chem. 52 (1980) 2215-2216
- 27 Owens, D.S.; Sturrock, P.E.: "*Determination of triazine pesticides by HPLC with swept potential electrochemical detection*" Anal. Chim. Acta 188 (1986) 269-274
- 28 Scanlon, J.J.; Flaquer, P.A.; Robinson, G.W.; O'Brien, G.W.; Sturrock P.E.: "*High-performance chromatography of nitrophenols with a swept-potential electrochemical detector*" Anal. Chim. Acta 158 (1984) 169-177
- 29 Msimanga, H.Z.; Sturrock, P.E.: "*Application of factor analysis on HPLC data using a swept potential ECD system*" Anal. Chem. 62 (1990) 2134-2140
- 30 Hanekamp, H.B.; Voogt, W.H.; Bos, P.; Frei, R.W.: "*A pulse polarographic detector for HPLC; determination of nitrazepam*" J. Liq. Chromatogr. 3,8 (1980) 1205-1217
- 31 Sithole, B.B.; Guy, R.D.: "*Separation of nitroimidazoles by reversed-phase high-pressure liquid chromatography*" Talanta 33,1 (1986) 95-97
- 32 Qian, X.-X.; Nagashima, K.; Hobo, T.; Guo, Y.-Y.; Yamaguchi, C.: "*High-performance liquid chromatography of thiols with differential pulse polarographic detection of the catalytic hydrogen evolution current*" J. of Chromatogr. 515 (1990) 257-264
- 33 Štastný, M.; Volf, R.; Benadiková, H.; Vít, I.: "*A versatile voltammetric detector with double polarization pulse and semi-differential scanning for LC*" J. Chromatogr. Sci. 21 (1983) 18-24
- 34 Vanderberg, P.; Johnson, D.C.: "*Comparison of pulsed amperometric detection and integrated voltammetric detection for organic sulfur compounds in liquid chromatography*" Analytica Chimica acta 290 (1994) 317-327
- 35 Sauer, D.; Spahn, E.: "*Flow-through voltammetry (FTV) with the hanging mercury drop electrode (HMDE)*" Fresenius' J. Anal. Chem. 351 (1995) 154-157

- 36 Lloyd, J.B.F.: "*Diphenylamine traces in handwabs and clothing debris: cleanup and liquid chromatography with sequentialoxidative and reductive electrochemical detection*" Anal. Chem. 59 (1987) 1401-1404
- 37 Lloyd, J.B.F.: "*Microcolumn clean-up and recovery techniques for organic explosives compounds and for propellants traces in firearms discharge residues*" J. Chromatogr. 330 (1985) 121-129
- 38 Parsons, P.J.; Le Roy, A.F.: "*Determination of cis-diaminedichloroplatinum(II) in human plasma using ion-pair chromatography with electrochemical detection*" J. Chromatogr. 378 (1986) 395-408
- 39 Schmidt, T.; Emons, H.: "*Tensammetric and indirect amperometric detection of phospholipids*" Electroanalysis 3 (1991) 543-551
- 40 Goicolea, M.A.; de Balugera, Z.G., Portela, M.J.; Barrio, R.J.: "*Determination of N-nitrosopiperidine in beers by liquid chromatography with reductive amperometric detection at a hanging mercury drop electrode*" Anal. Chim. Acta 305 (1995) 310-317
- 41 Holak, W.; DiPromisso, V.; Malek, E.G.: "*Reductiv voltammetric HPLC detection of aflatoxins: Determination of aflatoxin B₁ in Foods*" J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 20,7 (1997) 1057-1065
- 42 Babel, B.: "*Voltammetrische Detektion in der HPLC*" Dissertation 1994, Universität Würzburg
- 43 Elferink, F.; van der Vijgh, W.J.F.; Pinedo, H.M.: "*On-line differential pulse polarographic detection of carboplatin in biological samples after chromatographic separation*" Anal. Chem. 58 (1986) 2293-2296
- 44 Sybilska, D.; Przasnyski, M; Mysior, B; Samochocka, K.: "*Simple determination of cysteine and cystine in dilute solutions by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a DC-TAST polarograph*" J. Chromatogr. 283 (1984) 453-458
- 45 Debowska, B.; Samochocka, K; Przasnyski, M; Sybilska, D.: "*Simultaneous determination of thiols and corresponding disulphides in mixtures by high-performance liquid chromatography with polarographic detection using a dual-tast analyser*" J. Chromatogr. 455 (1988) 336-343

- 46 Reardon, P.A.; O'Brian, G.E.; Sturrock, P.E.: "*A swept-potential electrochemical detector for flow streams*" *Anal. Chim. Acta* 162 (1984) 175-187
- 47 Just, P.; Karakaplan, M.; Henze, G.; Scholz, F.: "*Properties of amperometric HPLC detectors based on mercury electrodes*" *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 32-35
- 48 Economou, A.; Fielden, P.R.: "*Selective determination of Ni(II) and Co(II) by flow injection analysis and adsorptive cathodic stripping voltammetry on a wall jet mercury film electrode*" *Talanta* 46, 5 (1998) 1137-1146
- 49 Rocha, M.M.G.S.; Neto, M.M.P.M.; Torres, M.O.; de Varennes, A.: "*Square wave adsorptive stripping voltammetry of nickel(II) in flowing systems at a wall-jet mercury film electrode plated in situ*" *Electroanalysis* 9 (1997) 145-149
- 50 Greenway, G.M.; Wolfbauer, G.: "*On-line determination of vanadium by adsorptive stripping voltammetry*" *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 15-25
- 51 Neto, M.M.P.M.; Rocha, M.M.G.S.; Brett, C.M.A.: "*Square Wave adsorptive stripping voltammetry of molybdenum(VI) in continuous flow at a wall-jet mercury film electrode sensor*" *Talanta* 41, 9 (1994) 1597-1601
- 52 Dalangin, R.D.; Gunasingham, H.: "*Anodic stripping voltammetry with a triton X-100 modified mercury film electrode using flow injection*" *Analyst* 119 (1994) 1603-1606
- 53 Aldstadt, J.H.; King, D.F.; Dewald, H.D.: "*Flow injection potentiometric and voltmmetric stripping analysis using a dialysis membrane covered mercury film electrode*" *Analyst* 119 (1994) 1813-1818
- 54 Frenzel, W.: "*Mercury films on a glassy carbon support: attributes and problems*" *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 123-137
- 55 Hoogvliet, J.C.; Reijn, J.M.; van Bennekom, W.P.: "*Multichannel amperometric detection system for liquid chromatography and flow injection analysis*" *Anal. Chem.* 63 (1991) 24-18-2423
- 56 Fielden, P.R.; McCreedy, T.; Ruck, N.; Vaireanu, D.-I.: "*Amperometric arrays in flowing solution analysis*" *Analyst* 119 (1994) 953-958

- 57 Aoki, A.; Matsue, T.; Uchida, I: “*Multichannel electrochemical detection with microelectrode array in flowing streams*” Anal. Chem. 64 (1992) 44-49
- 58 Barek, J.; Cvacka, J.; Zima, J.: “*A study of HPLC separation and spectrophotometric and voltammetric detection of 4'-substituted derivatives of 3-carboxy-4-hydroxy-6-acetylaminoazobenzene*” Fresenius J. Anal. Chem. 358 (1997) 493-499
- 59 Niwa, O.; Tabei, H.; Solomon, B.P.; Xie, F.; Kissinger, P.T.: “*Improved detection limit for catecholamines using liquid chromatography-electrochemistry with a carbon interdigitated array microelectrode*” J. Chromatogr. B 670 (1995) 21-28
- 60 Matson, W.R.; Langlais, P.; Volicer, L.; Gamache, P.H.; ; Bird, E.D.; Mark, K.A.: “*n-Electrode three-dimensional liquid chromatography with electrochemical detection of neurotransmitters*” Clin. Chem. 30 (1994) 1477-1488
- 61 Acworth, I.N.; Naoi, M.; Parvez, H.; Parvez, S.: “*Progress in HPLC-HPCE - Volume 6: Coulometric electrode array detectors for HPLC*” VSP, Utrecht, 1997
- 62 Acworth, I.N.; Gamache, P.H.: “*The coulometric electrode array for use in HPLC analysis. Part 1: Theory*” Am. Lab. 5 (1996) 33-38
- 63 Acworth, I.N.; Waraska, J.; Gamache, P.H.: “*The coulometric electrode array for use in HPLC analysis. Part 2: Application overview*” Am. Lab. 11 (1996) 24I-24T
- 64 Rohwedder, J.J.R.; Pasquini, C.: “*Multi-electrode detection in voltammetry. Part 2. Evaluation of a Hadarmard multiplexed voltammetric technique*” Analyst 123 (1998) 1861-1866
- 65 Bross, C.; Springer, S.; Sonntag, G.: “*Determination of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in a cigarette smoke condensate by HPLC with an electrode array detector*” Dtsch. Lebensm. Rdsch. 93,12 (1997) 384-386
- 66 Bernwieser, I.; Pätzold, R.; Galensa, R.; Sonntag, G.: “*HPLC mit coulometrischer Elektroden-Array-Detektion*” Z. Lebensm. Unters. Forsch. 198 (1994) 40-43
- 67 Sonntag, G.; Bernwieser, I.; “*HPLC coupled with a coulometric electrode array detector*” Dtsch. Lebensm. Rdsch. 90,3 (1994) 72-74

- 68 Bernwieser, I.; Sonntag, G.: "HPLC with electrode array detection: determination of amitrole in drinking and ground water" *Fresenius' J. Anal. Chem.* 347 (1992) 559-561
- 69 Hill, B.A.; Kleiner, H.E.; Ryan, E.A.; Dulik, D.M.; Monks, T.J.; Lau, S.S.: "Identifiacation of multi-S-substituted conjugates of hydroquinone by HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy" *Chem. Res. Toxicol.* 6 (1993) 459-469
- 70 Ternes, W.; Rüssel-Sinn, H.A.: "Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrol) in tissues with electrochemical detection by ion-pair high performance liquid chromatography" *Fresenius J. Anal. Chem.* 329 (1987) 757-759
- 71 Colombo, C.; van den Berg C. M.G.: "In-line deoxygenation for flow analysis with voltammetric detection" *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 229-240
- 72 Dr. Ing. Herbert Knauer Wissenschaftlicher Gerätebau: "Benutzerhandbuch- Knauer 4-Kanal Online Degasser" Berlin (1992)
- 73 Perkow, W.: "Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel" Verlag Paul Parey, 3. Aufl. 1994 Band 2
- 74 Bird, C.L.; Kuhn, A.T.: "Electrochemistry of the viologens" *Chem. Soc. Rev.* 10 (1981) 49-82
- 75 Worobey, L.B.: "Liquid chromatographic method for determination of diquat and paraquat herbicides in potatoes: collaborative study" *J. of AOAC int.* 76, 4 (1993) 881-887
- 76 HP Environmental Solution Catalog: "Application note, EPA Method 549, Herbicides- Water analysis, LC" 1995/96, S. 92
- 77 Carneiro, M.C.; Puignou, L.; Galceran, M.T.: "Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase ion-pair hplc for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat" *J. of Chromatogr. A* 669 (1994) 271-224
- 78 Madhu, C.; Gregus, Z.; Klaassen, C.D.: "Simple method for analysis of diquat in biological fluids and tissues by high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. B*, 674 (1995) 193-196

- 79 Sellero, I.S.; Cruz, A.; Fernandez, P.; Rivadulla, M.L.: "*Liquid chromatographic method for simultaneous determination of paraquat and diquat in plasma, urine and vitrous humour*" J. Liq. Chromatogr. & Rel Technol., 19, 12 (1996) 2009-2024
- 80 Kamphampati, I.; Roinestad, K.S.; Hartman, T.G.; Rosen, J.D.; Fukuda, E.K.; Lippincott, R.L.; Rosen, R.T.: "*Determination of diquat and paraquat in water using hplc with confirmation by liquid chromatography - particle beam mass spectroscopy*" J. of Chromatogr. A 688 (1994) 67-73
- 81 Reichert, J.K.; Lochtmann, J.; Huschens, O.: "*Bestimmung pestizidwirksamer quaternärer Ammoniumverbindungen in wässriger Phase, beispielhaft ausgeführt für die Wirkstoffe Paraquat, Deiquat und Difenzoquat mittels HPLC*" GWF Wasser Abwasser 134, 10 (1993) 620-622
- 82 Nagayama, T.; Maki, T.; Kan, K.; Iida, M.; Nishima, T.: "*Reversed phase liquid chromatographic determination of paraquat and diquat in agricultural products*" J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 6 (1987) 1008-1011
- 83 Ibañez, M; Pico, Y.; Mañes, J.: "*Influence of organic matter and surfactants on solid phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters*" J. Chromatogr. A 727 (199) 245-252
- 84 Ibañez, M; Pico, Y.; Mañes, J.: "*On-line liquid chromatographic trace enrichment and high-performance liquid chromatographic determination of diquat, paraquat and difenzoquat in water*" J. of Chromatogr. A 728 (199) 325-331
- 85 Täufel, A.; Ternes, W.; Tunger, L.; Zobel, M.: "*Lebensmittel-Lexikon*" Behr's Verlag, Hamburg, 1993
- 86 Purev, O.; Pospíšil, F.: "*Metabolism of quercetin in cell suspension culture of nicotiana tabacum l.*" Biologia Plantarum (Praha) 31, 3 (1998) 182-187
- 87 Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A.: "*Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties*" Biochem. J. 330 (1998) 1173-1178
- 88 Igarashi, K.; Komatsu, C.; Shimada, T.: "*2,5,7,3',4'-Pentahydroxy-3,4-flavandione as an intermediate product in the enzyme-catalyzed oxidation of quercetin*" Agric. Biol. Chem. 55, 3 (1991) 855-857

- 89 Schwarz, K.; Ernst, H.; Ternes, W.: "Evaluation of antioxidative constituents from thyme" J. Sci Agric (1996) 70, 217-223
- 90 Jungbluth, G.: "... " Dissertation 1999, Universität Hannover, in Vorbereitung
- 91 Heyrovsky, M.: "The electroreduction of methylviologen" J. Chem. Soc., Chem. Commun. 24 (1987) 1856-1857
- 92 Polák, J.; Volke, J.: "Stanovení bipyridyliových herbicidů methodou diferenční pulsní polarografie" Chemické listy / svasek 77 (1983) 1190-1195
- 93 Lezna, R.O.; Centeno, S.A.: "Spectroelectrochemistry of methylviologen at mercury film electrodes" Langmuir 12 (1996) 591-593
- 94 Pospíšil, L.; Colombini, M.P.; Fuoco, R.: "Electrochemical properties of difenzoquat herbicide (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium)" J. Electroanal. Chem. 310 (1991) 169-178
- 95 Fuoco, R.; Pospíšil, L.; Colombini, M.P.; Perla, M.: "Properties of N-heterocyclic herbicides and fungicides at electrochemical interfaces" Ann. Chim. (Rome) 82 (1992) 247-258
- 96 Pospíšil, L.; Hanalík, J.; Fuoco, R.; Fanelle, N.: "Growth of compact layers at the interface - Part VI - Adsorption properties of difenzoquat herbicide (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium)" J. Electroanal. Chem. 334 (1992) 309-321
- 97 Walcarius, A.; Lamberts, L.: "Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution" J. Electroanal. Chem. 406 (1996) 59-68
- 98 Zen, J.M.; Jeng, S.-H.; Chen, H.-J.: "Determination of paraquat by square-wave voltammetry at a perfluorosulfonated ionomer / clay-modified electrode" Anal. Chem. 68 (1996) 498-502
- 99 Luque, M.; Rios, A.; Valcárel, M.: "Electroanalytical - Sensitive determination of paraquat and diquat at the sub-ng ml⁻¹ level by continuous amperometric flow methods" Analyst 123, 11 (1998) 2383-2388
- 100 Saad, B.; Ariffin, M.M.; Saleh, M.I.: "Paraquat sensors containing membrane components of high lipophilicities" Anal. Chim. Acta 338 (1997) 89-96

- 101 Saad, B.; Ariffin, M.; Saleh, M.I.: "*Flow injection potentiometric determination of paraquat in formulations and biological samples*" *Talanta* 47, 5 (1999) 1231-1236
- 102 Vermillion, F.T.; Pearl, I.A.: "*Anodic reactions of simple phenolic compounds*" *J. Electrochem. Soc.* (1994) 11, 1598
- 103 Lau, O.; Luk, S.; Wong, W.: "*Simultaneous determination of methylsalicylat and thymol in various pharmaceutical formulations by differential pulse voltammetry using a glassy carbon electrode*" *Analyst*, 113 (1988) 865-868
- 104 Born, M.; Carrupt, P.-A.; Zini, R.; Brée, F.; Tillement, J.-P.; Hostettmann, K.; Testa, B.: "*Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols*" *Helv. Chim. Acta* 79 (1996) 1147-1158
- 105 Hendrickson, H.P.; Kaufman, A.D.; Lunte, C.E.: "*Electrochemistry of catechol-containing flavonoids*" *J. Pharm. Biomed. Analysis* 12, 3 (1994) 325-334
- 106 Hendrickson, H.P.; Kaufman, A.D.; Lunte, C.E.: "*Relationchip of flavonoid oxidation potential and effect on rat hepatic microsomal metabolism of benzene and phenol*" *J. Pharm. Biomed. Analysis* 12, 3 (1994) 335-341
- 107 Jørgensen, L.V.; Cornett, C.; Justesen, U.; Skibsted, L.H.; Dragsted, L.O.: "*Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring*" *Free Rad. Res.* 29 (1998) 339-350
- 108 Engelkemeir, D.W.; Geissman, T.A.; Crowell, W.R.; Friess, S.L.: "*Flavones and related compounds. IV. The reduction of some naturally occurring flavones at the dropping mercury electrode*" *J. Am. Chem Soc.* 69 (1947) 155-159
- 109 Zoulis, N. E.; Efstathiou, C.E.: "*Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids*" *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 255-261
- 110 Fahrat, F.; Kallel, M.; Caiola, A.; Cantin, D.; Alary, J.: "*Determination polarographique de facteurs vitaminiques P (rutine et ses derives)*" *Talanta* 31, 8 (1984) 615-618
- 111 El-Maali, N.A.; Temerk, Y.M.; El-Aziz, M. S.-A.: "*Application of stripping voltammetry at a static mercury drop electrode for the determination of aluminium and iron in Portland cement*" *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 313-318

- 112 Farias, P.A.M.; Martins, C.M.L.; Ohara, A.K.; Gold, J.S.: "*Cathodic adsorptive stripping voltammetry of indium complexed with morin at a static mercury drop electrode*" *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 29-34
- 113 DIN 32645, chemische Analytik: "*Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze - Ermittlung unter Wiederholbedingungen*" Mai 1994
- 114 Doerffel, K.: "*Statistik in der analytischen Chemie*" Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH Leipzig 5. Aufl.1990
- 115 Benutzerhandbuch: "*VA Prozessor 693, VA Stand 694*" Metrohm, Herisau, Schweiz
- 116 Bond, A. M., Grabaric, B.S.: "*Simple approach to the problem of overlapping waves using a microprocessor controlled polarograph*" *Anal. Chem.* 48, 11 (1976) 1624-1628
- 117 Morrey, J.R.: "*On determining spectral peak positions from composite spectra with a digital computer*" *Anal. Chem.* 40, 6 (1968) 905 -914
- 118 Kuhrig, B.: "*The direct evaluation of overlapping signals in square wave polarography*" *Z. Chem.* 18, 11 (1978) 415-417
- 119 Bourdreau, P. A., Perone, S.P.: "*Quantitative resolution of overlapped peaks in programmed potential-step voltammetry*" *Anal. Chem.* 51, 7 (1979) 811
- 120 Lewin, U.: "*Untersuchung zur Analytik von Sprengstoffen sowie deren Neben- und Abbauprodukten in Wasserproben der Rüstungsaltestlast Elsnig*" Dissertation 1996, Universität Leipzig
- 121 Autorenkollektiv: "*Bestimmung von Cadmium und Blei im Spurenbereich in Wässern und Aufschlußlösungen in der Durchflußzelle EFTA mit Glassy-Carbon-Arbeits Elektrode am Quecksilberfilm*" Application Bulletin Nr. 258/1d, Metrohm (Herisau, Schweiz)
- 122 Rühling, I.; Schäfer, H; Ternes, W.: "*HPLC online reductive scanning voltammetric detection of diquat, paraquat and difenzoquat with mercury electrodes*" *Fresenius' J. Anal. Chem.* (1999) in press

- 123 Lauren, D.R.; Agnew, M.P.: "*Anomalies in the high-performance liquidchromatographic determination of diquat in water samples*" J. Chromatogr. 303 (1984) 206-210
- 124 DIN 38406, Teil 16: "*Kationen der Gruppe E, Bestimmung von Zink, Cadmium, Blei, Kupfer, Thallium, Nickel und Cobalt mittels Voltammetrie in Trink-, Grund-, Oberflächen- und Niederschlagswässern*" 1990
- 125 Kolb, M.; Rach, P.; Schäfer, J.; Wild, A.: "*Investigations of oxidative UV photolysis - I. Sample preparation for the voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, Cu, Ni and Co in waters*" Fresenius'J. Anal. Chem. 342 (1992) 341-349
- 126 Selisker, M.,Y.; Herzog, D.P.; Erber, R.D.; Fleeker, J.R.; Itak, J.A.: "*Determination of paraquat in fruits and vegetables by a magnetic particle based enzyme-linked immunosorbent assay*" J. Agr. Food Chem. 43, 2 (1995) 544-547
- 127 Rippen, G.: "*Handbuch Umweltchemikalien, Gesetze und Verordnungen über Umweltchemikalien*" Ecomed (1998), Band 4, III - 8
- 128 Deutsche Forschungsgemeinschaft: "*Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*" VCH, Weinheim (1991), Band 1, XI - 6
- 129 Volke, J.; Liška, F.: "*Electrochemistry in organic synthesis*" Springer-Verlag, Heidelberg (1994)

7 Anhang

7.1 Abbildungen

Abb. 3.1:	Übersicht über elektrochemisch analytische Methoden	4
Abb. 3.2:	Cyclisches Voltammogramm einer reversiblen, einstufigen Reduktion. Aus der Zeichnung gehen die Peakpotentiale (E_{ox} , E_{red}) und -ströme (I_{ox} , I_{red}) hervor	12
Abb. 3.3.a:	Treppenstufen Spannungsrampe mit aufmodulierten Pulsen - Differenzpuls Voltammetrie (DPV). Aus der Abbildung gehen die Stufenweite t_{step} , die Stufenhöhe U_{step} , die Pulshöhe U_{puls} , die Dauer des Meßintervalls t_{mess} und des Pulses t_{puls} hervor.	14
Abb. 3.3.b	Rechteck Voltammetrie (SQWV), Messintervalle = grau hinterlegt	14
Abb. 3.4.a:	Typische Kurvenform $I = f(U)$ in der hydrodynamischen DC Voltammetrie, z.B. Polarographie oder Voltammetrie an der rotierenden Scheibenelektrode. Der Auftragung sind der Diffusionsgrenzstrom ($I_{diffusion}$) und das Halbstufenpotential ($E_{1/2}$) zu entnehmen.	15
Abb. 3.4.b:	Kurvenform mit differentieller Voltammetrie, es geht der Peakstrom (I_p) und das Halbstufenpotential ($E_{1/2}$) hervor.	15
Abb. 3.5:	Zellentypen für Festkörperelektroden. WE = Arbeitselektrode, AE = Gegenelektrode, RE = Referenzelektrode	18
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung der Durchflußzellen für Quecksilberelektroden (a und b: Offene Bauweise; c: Geschlossene Bauweise)	23
Abb. 3.7:	Schematische Darstellung des amperometrischen Array-Detektors nach Hoogvliet [55], (Abb. 3.7.a: Elektrodenplatte von oben betrachtet, Abb. 3.7.b: Querschnitt, WE = Arbeitselektrode, AE = Gegenelektrode). Die Referenzelektrode ist außerhalb dieses Gehäuses platziert.	25
Abb. 3.8:	Schematische Darstellung eines oxidativ arbeitenden amperometrischen Elektrodenarrays, Reihenschaltung (a) und Parallelschaltung (b)	25
Abb. 3.9.:	Schematische Darstellung eines coulometrischen Elektroden Array-Detektors mit vier Arbeitselektroden. Das Wirkprinzip wird hier anhand zweier Oxidationsreaktionen an den Elektroden E_1 und E_2 illustriert	26
Abb. 3.10:	Strukturformeln der vier quaternären Ammonium-Ionen	29
Abb. 3.11:	Strukturformeln der drei monocyclischen Phenole	31
Abb. 3.12:	Grundgerüst der Flavonoide	32
Abb. 3.13:	Cyclovoltammetrie von Paraquat an einer MFE ($c = 360 \mu\text{g/mL}$), in $0,1 \text{ mol/L}$ wäßriger NaF Lösung, $v = 100 \text{ mV/s}$ [92]	35
Abb. 3.14:	Elektrochemische Oxidation des Phenols im sauren Medium	37
Abb. 3.15:	Elektrochemische Oxidation des Phenols im alkalischen Medium	38

Abb. 3.16: Mechanismus der elektrochemischen Oxidation von Quercetin im wässrigen Medium [107]. I = Quercetin, IX = 2,3',4',5,7-Pentahydroxiflavan-3,4-dion, XI = 2-(3,4-Dihydroxibenzoyl)-2,4,6-trihydroxi-3(2H)-benzofuranon	39
Abb. 4.1: Chromatogramm mit HPLC-UV-D der vier quaternären Ammoniumverbindungen mit einer Konzentration von je 40 µg/mL	44
Abb. 4.2: Elutionsprofil der vier quaternären Ammoniumverbindungen von 500 mg Kieselgel-Festphase, dotiert wurden 25 ng je Analyt	45
Abb. 4.3.a: SQW-Polarographie der drei Herbizide im Batch, c = 1 µg/mL, Bedingungen entsprechend Versuch Nr. 2, Tab. 4.2	47
Abb. 4.3.b: DP-Polarographie der drei Herbizide im Batch, c = 1 µg/mL, Bedingungen entsprechend Versuch Nr. 4, Tab. 4.2	47
Abb. 4.4: Nachweisgrenzen der drei Herbizide mit SQWP (Versuche Nr. 2, Vorwärtsscan und 3, Rückwärtsscan), sowie mit DPP (Versuche Nr. 4, Vorwärtsscan und 5, Rückwärtsscan)	48
Abb. 4.5: DP- Polarogramme von DF und dem reinen Grundelektrolyten	49
Abb. 4.6: DP -Polarogramme unter Variation der Grundelektrolytzusammensetzung	50
Abb. 4.7: Signalthöhen von DF (9 µg/mL) und der Störung unter Variation des pH-Wertes des Grundelektrolyten	50
Abb. 4.8: Signalthöhen von DF (9 µg/mL) und der Störung unter Variation der Zusammensetzung des Grundelektrolyten	51
Abb. 4.9: Abhängigkeit der Adsorptionspeakhöhe von der Modulationsfrequenz; hier unter Verwendung einer Lösung von 15 mg/mL PQ im Eluenten ohne Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen	51
Abb. 4.10: Peakflächen für DF und DQ versus Gelatinekonzentrationen und Bloomhärte. Die Daten für DF sind untergrundkorrigiert	52
Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Meßanordnung	55
Abb. 4.12: Chromatogramm der vier quaternären Ammoniumverbindungen ($c_{DQ} = 37 \mu\text{g/mL}$, $c_{PQ} = 37 \mu\text{g/mL}$, $c_{EQ} = 44 \mu\text{g/mL}$, $c_{DF} = 64 \mu\text{g/mL}$) mit HPLC-HDVD; Messmethode: DPV am hängenden Quecksilbertropfen; Meßzelle: EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur	57
Abb. 4.13: Schematische Darstellung der Detektorzelle EFTA mit einer HMDE und Luftblase, die den Kontakt zur Referenzelektrode unterbricht	58
Abb. 4.14: Schematische Darstellung der W-Kanal EFTA für die Anwendung der HMDE in fließenden Systemen	59
Abb. 4.15: Explosionszeichnung der Wall-Jet Zelle. Als Arbeitselektrode wurde eine MFE auf Basis einer Glaskohle Elektrode ($\varnothing 3\text{mm}$) verwendet, als Referenzelektrode eine Ag/AgCl (3 mol/L KCl) und als Gegenelektrode eine Goldelektrode.	60
Abb. 4.16: HPLC-HDVD Chromatogramm mit Differenzpuls Voltammetrie als Detektionsmethode, MFE in der herkömmlichen EFTA, Meßanordnung II. Die injizierte Menge von 80 ng entspricht einer Konzentration von 40 µg/mL pro Analyt	61

- Abb. 4.17: Darstellung eines HPLC-HDVD Chromatogramms mit Differenzpuls Voltammetrie als Detektionsmethode als contour plot. Der Datensatz ist identisch mit dem in Abb. 4.14 dargestellten. Die injizierte Menge von 80 ng entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$ pro Analyt 62
- Abb. 4.18: Chromatogramm der beiden quaternären Ammoniumverbindungen in einer Konzentration von je 25 $\mu\text{g/mL}$ aufgenommen mit Differenzpuls Voltammetrie an der MFE in der Wall-Jet Zelle. Die Scan-Nummer ist proportional zur Retentionszeit 64
- Abb. 4.19: Untergrundkorrigierte Differenzpuls Voltammogramme (MFE in der Wall-Jet Zelle, $c = 10 \mu\text{g/mL}$). Entnommen beim Peakmaximum des Chromatogramms aus der Datenmatrix eines HPLC-HDVD Chromatogramms. 64
- Abb. 4.20: Chromatogramm einer Mischung der Vergleichssubstanzen ($c = 10 \mu\text{g/mL}$) mit fehlerhafter Peakform bei amperometrischer Detektion (-800 mV) an der HMDE in der W-Kanal EFTA. Zum Vergleich ein Chromatogramm des injizierten Eluenten, der Grundlinienversatz baut sich erst ab, wenn eine neue HMDE erzeugt wird. 65
- Abb. 4.21: On line Messungen mit DC Voltammetrie mit dem VA Prozessor 396, verschiedene Konzentrationen wurden bestimmt. Es werden die gemessenen Ströme bei -800 mV angezeigt. Die grauen Umrandungen bezeichnen die scans, die innerhalb eines Programmblocks abgearbeitet wurden 67
- Abb. 4.22: Beispiel-Chromatogramme eines Multistandards (10 $\mu\text{g/mL}$) unter identischen Bedingungen mit HPLC-HDVD, hier DC Voltammetrie, HMDE Größe 5, $U = -800 \text{ mV}$ 70
- Abb. 4.23: Chromatogramm eines Multistandards (10 $\mu\text{g/mL}$) mit HPLC-Amperometrie, HMDE Größe 5, $U = -800 \text{ mV}$, EFTA mit herkömmlicher Zellarchitektur 72
- Abb. 4.24.a: Chromatographische Peakhöhen mit HPLC-HDVD (DC Voltammetrie) an der MFE in der Wall-Jet Zelle unter Variation der Stufenweite (U_{step}) und der Spannungsvorschubgeschwindigkeit (dU/dt), hier exemplarisch für DQ 75
- Abb. 4.24.b: Relative Standardabweichungen (rsd) der in Abb. 4.23.a dargestellten Versuchsserie 75
- Abb. 4.25: Dreidimensionales HPLC-HDVD Chromatogramm von DQ, PQ, EQ und DF (alle 10 mg/mL), hier mit Differenzpuls Voltammetrie an der HMDE in der W-Kanal EFTA, die Daten sind untergrundkorrigiert 79
- Abb. 4.26: Ausschnitt aus dem Chromatogramm aus Abbildung 4.24 - Darstellung als zweidimensionales Chromatogramm, die Ströme wurden bei -0,51 V; -0,6 V und -1,41 V entnommen 80
- Abb. 4.27.a: Hydrodynamische Voltammogramme von DQ, PQ und EQ mit MP Detektion an der HMDE in der W-Kanal EFTA 80
- Abb. 4.27.b: Hydrodynamische Voltammogramme von DF und des Eluenten mit MP Detektion an der HMDE in der W-Kanal EFTA 80
- Abb. 4.28: Chromatogramm mit HPLC-HDVD der drei Phenole p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol ($c = 33 \mu\text{g/mL}$), Detektionstechnik Differenzpuls Voltammetrie 84
- Abb. 4.29.a: HPLC-HDVD Chromatogramm eines unbekanntes Reaktionsproduktes, das bei der Lagerung von p-Cymen-2,3-diol Lösungen unter Zutritt von Sauerstoff und Licht entsteht. 85

- Abb. 4.29.b: Voltammogramm des Reaktionsproduktes am Peakmaximum, identischer Datensatz wie in Abb. 4.29.a, Bestimmung des Halbstufenpotentials am Wendepunkt der Funktion $I = f(U)$ 85
- Abb. 4.30: Cyclovoltammogramme von Quercetin ($c = 20 \mu\text{g/mL}$) unter Variation des Verhältnisses von wässrigem zum Acetonitril-Anteil im Grundelektrolyten, $dU/dt = 50 \text{ mV/s}$ hier wird der Übersicht halber nur der Vorwärtsscan dargestellt 100
- Abb. 4.31: Cyclovoltammogramme von Quercetin, Luteolin und dem Oxidationsprodukt des Quercetins mit jeweils $c = 20 \mu\text{g/mL}$, $dU/dt = 50 \text{ mV/s}$, Grundelektrolyt mit 20 vol% wässriger Essigsäure (2 %) und 80 vol% Acetonitril, Vorwärts- und Rückwärtsscan, alle Cyclovoltammogramme sind untergrundkorrigiert 101
- Abb. 4.32: Aus den Einzelmessungen durch Addition berechnete und gemessene (violetter und entfärbter Reaktionsansatz) Cyclovoltammogramme des Reaktionsgemisches, $dU/dt = 50 \text{ mV/s}$, $c_{\text{Acetonitril}} = 30 \text{ vol.-%}$, $c_{\text{Essigsäure}} 2 \text{ \%} = 70 \text{ vol.-%}$ 102
- Abb. 4.33.a: Cyclovoltammogramme des Quercetins unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit dU/dt , hier Vorwärtsscan, Grundelektrolyt bestehend aus 30 vol% Acetonitril und 70 vol% wässriger Essigsäure (2%) 103
- Abb. 4.33.b: Rückwärtsscan, Bedingungen wie bei Abb. 4.31.a 104
- Abb. 4.34: On-line Cyclovoltammogramme von Quercetin und dem Oxidationsprodukt des Quercetins (2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon), $dU/dt = 0,5 \text{ V/s}$ 105
- Abb. 4.35: Hydrodynamische Voltammogramme, aufgenommen unter Variation der Detektorspannung bei jeder Probeninjektion, $c = 20 \mu\text{g/mL}$ 106
- Abb. 4.36: Hydrodynamische Voltammogramme von Quercetin ($c = 40 \mu\text{g/mL}$), aufgenommen im fließenden System, bei unterschiedlichen Flußgeschwindigkeiten, $dU/dt = 1 \text{ mV/s}$ 107
- Abb. 4.37: Voltammogramme von Quercetin ($c = 40 \mu\text{g/mL}$) in ruhender Lösung, aufgenommen in der Wall-Jet Zelle unter Variation der Spannungsvorschubgeschwindigkeit 108
- Abb. 4.38: Voltammogramme von Quercetin (4.36.a) und dessen Oxidationsprodukt (4.36.b) aufgenommen nach der HPLC-Trennung eines Gemisches ($c = 100 \mu\text{g/mL}$) im Stopped-Flow Modus in der Wall-Jet Zelle, $dU/dt = 1 \text{ mV/s}$ 109

7.2 Abkürzungen und Formelzeichen

7.2.1 Abkürzungen

∅	Durchmesser
AD	analog - digital
AE	Gegenelektrode (auxillary electrode)
CE	Kapillarelektrophorese
DC	Gleichstrom (direct current)
DEA	Diethylamin
DF	Difenzoquat
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DME	tropfende Quecksilberlektrode (dropping mercury electrode)
DOS	Computer Betriebssystem (disc operating system)
DPP	Differenzpuls Polarographie
DPV	Differenzpuls Voltammetrie
DQ	Diquat
E 605	Parathion
ECD	elektrochemischer Detektor
EFTA	Durchflußzelle für elektrochemische Spurenanalytik (electrochemical flow-through trace analyzer)
EQ	Ethylparaquat
GC	Glaskohle (glassy carbon)
GPES	elektrochemisches Vielzwecksystem (general purpose electrochemical system)
HDV	hydrodynamische Voltammetrie
HDVD	hydrodynamisch- voltammetrische Detektion
HMDE	hängende Quecksilbertropfen Elektrode (hanging mercury drop electrode)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HSA	Heptansulfonsäure Natriumsalz

ID	Innendurchmesser
IR	Produkt aus Strom und Widerstand
IVD	integrierte voltammetrische Detektion
LD ₅₀	letale Dosis
MFE	Quecksilberfilm Elektrode (mercury film electrode)
MP	Multi-Puls
MPV	Multi-Puls Detektion
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
NWG	Nachweisgrenze
OSA	Octansulfonsäure Natriumsalz
PAD	gepulste, amperometrische Detektion (pulsed amperometric detection)
PC	Personalcomputer
PEEK	Polyetheretherketon
PQ	Paraquat
RAM	Speicher mit wahlfreiem Zugriff (random access memory)
RE	Referenzelektrode
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rsd	relative Standardabweichung (relative standard deviation)
SCE	gesättigte Kalomel Elektrode (saturated calomel electrode)
sd	Standardabweichung (standard deviation)
SMDE	kontrolliert tropfende Quecksilberelektrode (static mercury drop electrode)
SQWP	Rechteck Polarographie (squarewave polarography)
SQWV	Rechteck-polarographische Detektion
TEA	Triethylamin
TEAOH	Tetraethylammoniumhydroxid
UVD	Wellenlängen-Detektion
WE	Arbeitselektrode (working electrode)

7.2.2 Formelzeichen

A	Elektrodenoberfläche [m^2]	R	allgemeine Gaskonstante; $8,315 \text{ J}/(\text{K mol})$
c_{ox}	Konzentration der oxidierten Form [mol/m^3]	R	Widerstand [Ω]
c_{red}	Konzentration der reduzierten Form [mol/m^3]	t	Zeit [s]
D	Diffusionskoeffizient [m^2/cm]	T	Temperatur [K]
E	Elektrodenpotential [V]	t_{eq}	Zeit zur Gleichgewichtseinstellung [s]
E^0	Normalelektrodenpotential [V]	t_{mess}	Meß-Zeitintervall [s]
$E_{1/2}$	Halbstufenpotential [V]	t_{puls}	Pulsbreite [s]
F	Faraday Konstante; $9,6485 \cdot 10^4 \text{ C/mol}$	t_{step}	Stufenweite [s]
f	Frequenz [$1/s$]	U	Potential, Spannung [V]
I	Strom [A]	U_{puls}	Pulshöhe [V]
$I_{diffusion}$	Diffusionsgrenzstrom [A]	U_{start}	Startspannung [V]
I_p	Peakstrom [A]	U_{stop}	Stopspannung [V]
J	Fluß [$\text{mol}/(m^2 s)$]	U_{step}	Stufenhöhe [V]
k	homogene Ratenkonstante [$1/s$] heterogene Ratenkonstante [m/s]	U_{umkehr}	Umkehrpotential [V]
m	Masse [kg]	U_{width}	Basispeakbreite [V]
M	Molmasse [g/mol]	v	Spannungsvorschubsgeschwindigkeit [V/s]
n	Stoffmenge [mol]	V	Volumen [m^3]
Q	elektrische Ladung [C]	z	Anzahl der Elektronen, die im Redoxvorgang übergehen [$]$

7.3 Gerätekonfigurationen

<i>Tabelle 7.1: Zu Kapitel 4.1.2</i>		
Chromatographie	Vorsäule	5 mm x 4 mm ID, 3 µm Spherimage Kieselgel (Knauer, Berlin)
	analytische Säule	50 mm x 4 mm ID, 3 µm Spherimage Kieselgel (Knauer, Berlin)
	Ventil	Sechsportventil mit Rotor aus PEEK, 20 µL Probenschleife (Knauer, Berlin)
	Pumpe	Maxistar K-1000 mit Pumpenkopf aus PEEK
	Solvent für Vergleichs-substanzen	Methanol/Wasser 1 : 1
	Eluent	90 vol.-% H ₂ O 10 vol.-% Methanol 3 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2 % TEAOH* pH 3 (H ₂ SO ₄)
Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)	
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)	
Datenverarbeitung	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)	
*hergestellt aus einer 20 %igen Lösung		

<i>Tabelle 7.2: Zu Kapitel 4.1.3, Meßanordnung I</i>		
Potentiostat	Polarecord 629 *	
Meßstand	VA Stand 663*	
	Arbeitselektrode	Multimode Elektrode 6.1246.020* Kapillaren 6.1226.030*
	Gegenelektrode	Platin*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0728.000 und 6.1245.000*
	Meßgefäß	V = 10 mL, Glas 6.1415.210*
Datenaufnahme	AD Wandlerkarte für den PC: Nextview (BMC Systeme GmbH, Puchheim - Deutschland)	
Datenverarbeitung	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin) Excel (Microsoft Corporation) Origin 3.0 (MicroCal Inc., Northampton - USA)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.3: Zu Kapitel 4.1.3, Meßanordnung II</i>		
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 *	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Arbeitselektrode	Multimode Elektrode 6.1246.020* Kapillaren 6.1226.030*
	Gegenelektrode	Platinstift 6.0343.000*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0728.000 und 6.1245.000*
	Meßgefäß	V = 10 mL, Glas 6.1415.210*
Datenverarbeitung	Datenübertragung auf den PC mit Übertragungskabel 6.2125.070* Metrodata 693 VA BackUp 6.6017.000* Excel (Microsoft Corporation) Origin 3.0 (MicroCal Inc., Northampton - USA)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.4: Zu Kapitel 4.1.4, HPLC-HDVD</i>		
Chromatographie	Siehe Tabelle 7.1	
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 *	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Meßzelle	VA-Durchflußzelle EFTA mit geradem Kanal 6.5321.000*
	Arbeitselektrode	Multimode Elektrode 6.1246.020* Kapillaren 6.1226.030* Führungsrohr 6.1226.030*
	Gegenelektrode	GC in Elektrodenplatte 6.1251.010*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0728.000*
UV Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)	
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)	
Datenverarbeitung	Datenübertragung auf den PC mit Übertragungskabel 6.2125.070* Metrodata 693 VA BackUp 6.6017.000* Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin) Excel (Microsoft Corporation) Origin 3.0 (MicroCal Inc., Northampton - USA)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.5: Zu Kapitel 4.1.4, HPLC-HDVD mit optimierter Zelle</i>		
Chromatographie	siehe Tabelle 7.1	
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 *	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Meßzelle	VA-Durchflußzelle EFTA mit W- Kanal (noch keine Nummer)*
	Arbeitselektrode	Multimode Elektrode 6.1246.020* Kapillaren, silanisiert (noch keine Nummer) *
	Gegenelektrode	GC in Elektrodenplatte 6.1251.010*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0728.000*
UV Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)	
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)	
Datenverarbeitung	siehe Tabelle 7.4	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.6: Zu Kapitel 4.1.4, HPLC-HDVD mit der MFE</i>		
Chromatographie	siehe Tabelle 7.1	
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 * oder µAutolab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Meßzelle	Wall-Jet 6.6.5303.020*
	Arbeitselektrode	GC ø 3 mm 6.1246.020*
	Gegenelektrode	Gold im Wall-Jet Gehäuse eingelassen
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0727.000*
Schlauchpumpe	Sampling Unit 708*	
UV Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)	
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)	
Datenverarbeitung	siehe Tabelle 7.4 oder: GPES 4.4 für Windows 3.x (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.7: Zu Kapitel 4.1.5, Optimierung der Steuerungseinheit</i>	
Chromatographie	siehe Tabelle 7.1
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 * oder μ Autolab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)
Meßstand	für die EFTA: VA Stand 694*
	Meßzelle
UV Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)
Datenverarbeitung	siehe Tabelle 7.4 oder: GPES 3.4 unter DOS GPES 4.4 für Windows 3.x (beide: Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)
*Metrohm, Herisau - Schweiz	

<i>Tabelle 7.8: Zu Kapitel 4.1.6, Realproben mit HPLC-HDVD</i>	
Chromatographie	siehe Tabelle 7.1
Potentiostat	μ Autolab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)
Meßstand	VA Stand 694*, Steuerung der MME: VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 *
	Meßzelle
Schlauchpumpe	Sampling Unit 708*
Datenverarbeitung	siehe Tabelle 7.4 und 7.7
*Metrohm, Herisau - Schweiz	

<i>Tabelle 7.9: Zu Kapitel 4.1.7, Phenole mit HPLC-HDVD</i>		
Chromatographie	analytische Säule	250 mm x 4 mm ID, 5 µm RP 18 Purospher (Merck, Darmstadt)
	Eluent	50 vol.-% H ₂ O 0,2 % TEAOH 0,42 % Citronensäure Monohydrat 25 vol.-% Methanol 25 vol.-% Acetonitril
	Ventil	Sechsportventil mit Rotor aus PEEK, 20 µL Probenschleife (Knauer, Berlin)
	Solvent für Vergleichssubstanzen	Methanol
	Pumpe	Maxistar K-1000 mit Pumpenkopf aus PEEK
Potentiostat	VA Prozessor 693, Programm 5.693.0021 *	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Meßzelle	Wall-Jet 6.6.5303.020*
	Arbeitselektrode	GC ø 3 mm 6.1246.020*
	Gegenelektrode	Gold im Wall-Jet Gehäuse eingelassen
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0727.000*
UV Detektor	Variable Wavelength Monitor (Knauer, Berlin)	
Datenaufnahme	Well Chrom Interface Box V7566 Version 0696 (Knauer, Berlin)	
Datenverarbeitung	siehe Tabelle 7.4	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.10: Zu Kapitel 4.2.2, CV der Flavonoide im Batch</i>		
Potentiostat	μAutolab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)	
Meßstand	VA Stand 694*	
	Arbeitselektrode	GC ø 2 mm 6.1204.110*
	Gegenelektrode	Platinstift 6.0343.000*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0728.000 und 6.1245.000*
	Meßgefäß	V = 10 mL, Glas 6.1415.210*
Datenverarbeitung	GPES 4.4 für Windows 3.x (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

<i>Tabelle 7.11: Zu Kapitel 4.2.3, HPLC mit on-line elektrochemischer Detektion</i>		
Chromatographie	analytische Säule	Nucleogel RP 100 5 / 250, 250 mm x 4 mm ID (Macherey Nagel, Düren)
	Eluent	70 - 80 vol.-% wässrige Essigsäure (2%) 30 - 20 vol.-% Acetonitril
	Pumpe	Maxistar K-1000 mit Pumpenkopf aus PEEK
	Ventil	Sechsportventil mit Rotor aus PEEK, 20 μL Probenschleife (Knauer, Berlin)
	Solvent für Vergleichs-substanzen	Acetonitril
Detektion	Potentiostat	μAutolab (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)
	Arbeitselektrode	GC ø 3 mm 6.1246.020*
	Gegenelektrode	Platinstift 6.0343.000*
	Referenzelektrode	Ag/AgCl in 3 mol/L KCl 6.0727.000*
	Meßzelle	Wall-Jet 6.6.5303.020*
Datenverarbeitung	GPES 4.4 für Windows 3.x (Eco Chemie, Utrecht - Niederlande)	
*Metrohm, Herisau - Schweiz		

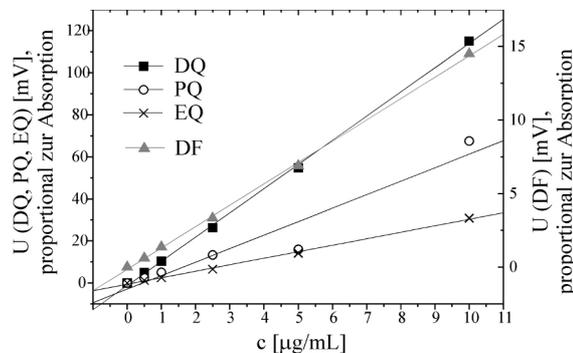
Tabelle 7.12: Zu Kapitel 4.2.3, Fließinjektionsanalyse und HPLC im Stopped-Flow Modus für cyclovoltammetrische Detektion

Chromatographie	siehe Tabelle 7.11	
Detektion		
Datenverarbeitung		
Fließinjektion & Stopped-Flow	Ventil 2	Sechsportventil (Knauer, Berlin)
	Kolbenpumpe	Pulsationsfreies Fördern der Flüssigkeit mit Flüssen von 1,25 µL/min bis 5 mL/min in 24 Stufen wählbar (Braun, Melsungen - Deutschland)

7.4 Kalibrationen

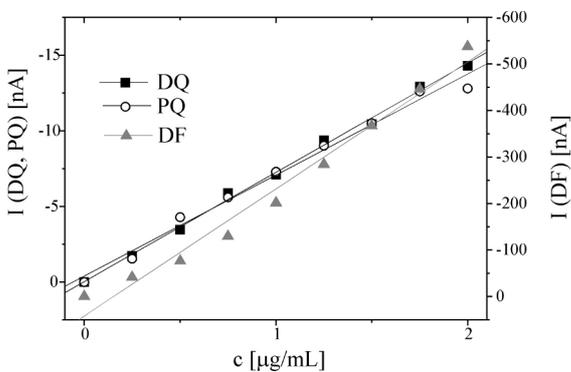
Zu Kapitel 4.1.2 und 4.1.6: HPLC-UVD

Kalibration mit HPLC-UVD für die Quantifizierung der Realproben in Kap. 4.1.6

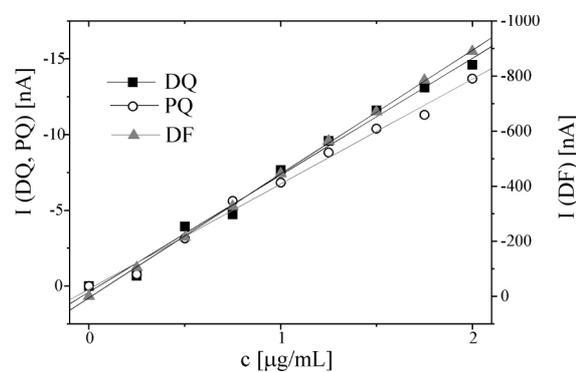


Zu Kapitel 4.1.3: Elektrochemische Vorversuche mit den Herbiziden im Batch

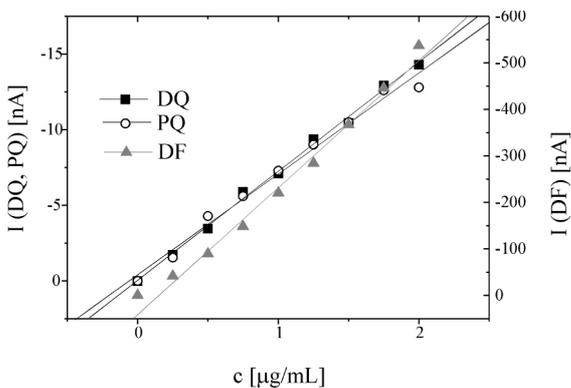
Batch, DPV, Rückwärtsscan, Versuchsbedingungen wie Tabelle 4.2



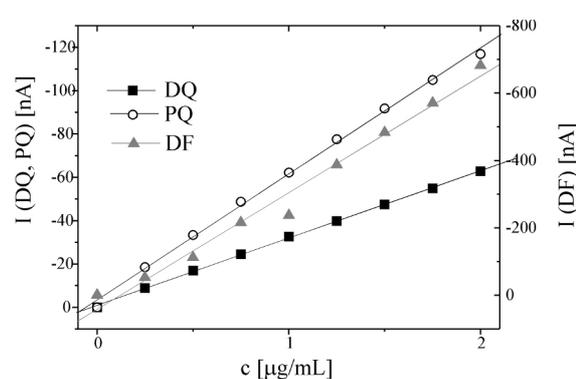
Batch, DPV, Vowärtsscan, Versuchsbedingungen wie Tabelle 4.2



Batch, SQWV, Rückwärtsscan, Versuchsbedingungen wie Tabelle 4.2

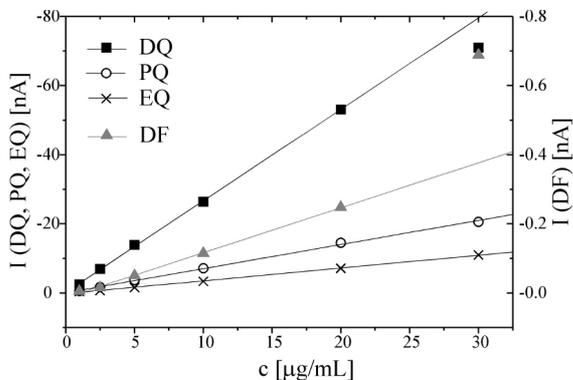


Batch, SQWV, Vowärtsscan, Versuchsbedingungen wie Tabelle 4.2

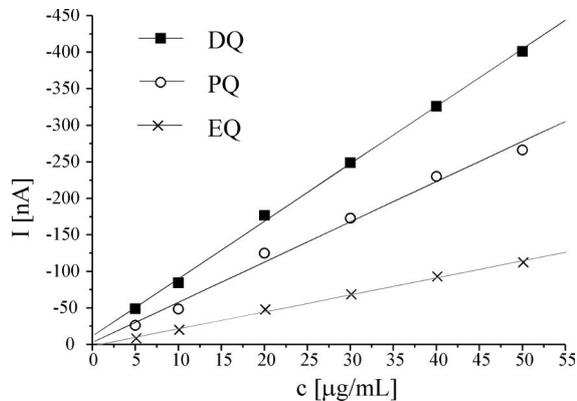


Kapitel 4.1.6: Elektrochemische Detektion der Herbizide an Quecksilberelektroden

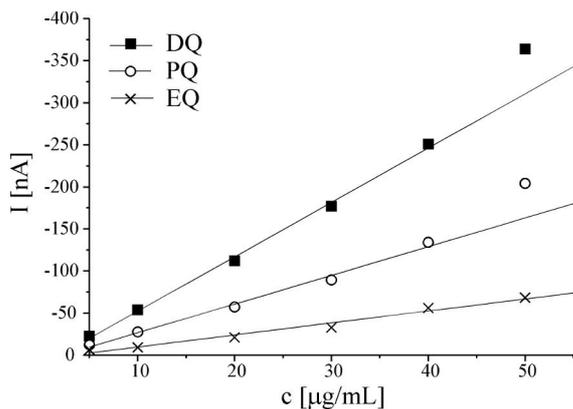
HPLC-MPV, HMDE, W-Kanal EFTA,
Tabelle 4.8



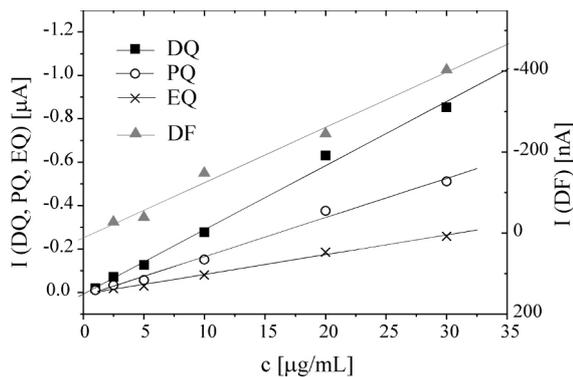
HPLC-MPV, MFE, Wall-Jet Zelle,
Tabelle 4.8



HPLC-Amperometrie, MFE, Wall-Jet Zelle,
Tabelle 4.8



HPLC-DPV, HMDE, W-Kanal EFTA,
Tabelle 4.8



Die Peakströme sind bei reduktiver Detektion negativ, bei den Steigungen der Kalibrationsgeraden (Tabelle 4.8) wurden die Beträge der Steigungen angegeben.

Dipl.-Chem. Irina Rühling
Emdenstr. 12
D-30167 Hannover

Eidesstattliche Erklärung

gemäß §4(2) d) der Gemeinsamen Ordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche für die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Universität Hannover

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich weder früher noch zur Zeit ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule oder einem anderen Fachbereich beantragt habe.

Ich versichere an Eides statt, daß ich die Dissertation

“Anwendung voltammetrischer Verfahren in Kopplung mit der HPLC zur Charakterisierung redoxaktiver Wirkstoffe”

selbstständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie die gegebenenfalls zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Ebenso habe ich diese Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Irina Rühling

Hannover, 11. Juni 1999

Lebenslauf	Dipl.-Chem. Irina Rühling
September 1996	Beginn der Dissertation mit dem Thema "Anwendung voltammetrischer Verfahren in Kopplung mit der HPLC zur Charakterisierung redoxaktiver Wirkstoffe" in der Fachrichtung analytische Chemie im Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Mai 1996	Abschluß des Studienganges Chemie
Dezember 1995 -Mai 1996	Diplomarbeit mit dem Thema "Probenaufarbeitung und Analyse von N-Nitrosaminen in Kautschuken und Elastomeren" in der Fachrichtung analytische Chemie im Deutschen Institut für Kautschuk-Technologie e.V., Hannover
September 1991	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Hannover
Juni - September 1991	Mitarbeit in der Synthese und Entwicklung organischer u. anorganischer Leuchtpigmente bei der Firma Riedel de-Haën, Seelze
Mai 1991	Abschluß der Ausbildung zur Chemielaborantin
August 1988	Beginn der Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Firma Riedel de-Haën, Seelze
Mai 1988	Abitur
1981	Besuch des Humboldt Gymnasiums in Hannover
1979	Besuch der Orientierungsstufe Salzmannschule in Hannover
1976	Besuch der Grundschule Hohes Ufer in Hannover
1975	Einschulung in der Grundschule Kiel-Schilksee
31.10.1969	Geboren in Hannover Tochter von Astrid Rühling (medizinisch technische Assistentin) und Burkhard Rühling (Dr. Ing., Architekt) Schwester von Ivika Rühling (Dipl. Agrar Ing.)
