Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft

Dem Fachbereich Chemie der Universität Dortmund
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

von
Diplom-Chemikerin
Georgia Voigt

Dortmund 2000

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund in Zusammenarbeit mit dem Instituto de Quimica der Bundesuniversität von Salvador/Bahia, Brasilien.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. D. Klockow für die interessante Themenstellung sowie die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. T. N. Mitchell danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herzlich danke ich auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Organische Analytik – insbesondere Dr. M. Schilling und Dr. P. Jacob – für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Vorkommen von Methanol und Ethanol in der Atmosphäre 6

1.2. Reaktionen der Alkohole in der Atmosphäre 8

1.3. Bisher beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Alkoholen in Außenluft 11

1.4. Aufgabenstellung 13

2. Untersuchungen zur Trennung und Bestimmung von Alkoholen in wässrigen Proben auf Basis enzymatischer Reaktionen 14

2.1. Oxidation von Methanol und Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase zu den jeweiligen Aldehyden 14

2.1.1. H_2O_2-Detektion durch luminometrische Verfahren 15

2.1.1.1. Bestimmung durch Chemilumineszenz und Untersuchung der Arbeitsparameter 15

2.1.1.2. Fluorimetrische H_2O_2-Bestimmung 22

2.1.2. Enzymatische Oxidation von Methanol und Ethanol unter Bildung von H_2O_2 27

2.1.3. Flüssig-Chromatographische Trennung der Alkohole 34

2.2. Oxidation von Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase 36

2.2.1. NADH-Detektion durch UV-photometrische bzw. fluorimetrische Verfahren 37

2.2.2. Steigerung des Nachweisvermögens durch Zugabe von Aldehyddehydrogenase (AlDH) 42

2.3. Kombinierte Anwendung der Enzyme Alkoholoxidase und Alkoholdehydrogenase 44

2.4. Vergleich der Bestimmungsmethoden für Methanol und Ethanol in wässriger Lösung 48

2.5. Experimentelles 50

2.5.1. Geräte und Materialien 50

2.5.2. Chemikalien 51

2.5.3. Immobilisierung der Glasperlen mitAlkoholoxidase 52

3. **Untersuchungen zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft** 53

3.1. **Methoden zur Herstellung von Testgasgemischen** 53

3.2. **Aufbau von Testgasquellen zur Erzeugung gasförmiger Alkohole im ppb_v-ppm_v-Bereich** 54

3.3. **Entwicklung einer diskontinuierlichen Probenahmemethode zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft** 61

3.4. **Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Bestimmung von Ethanol in Außenluft** 69

3.4.1. Untersuchung der Arbeitsparameter 71

3.4.2. Untersuchung des Einflusses von Ozon auf dieEthanolbestimmung 75

3.4.3. Kalibrierung und Ansprechzeit für die kontinuierlicheEthanolbestimmung in Außenluft 80

3.5. **Experimentelles** 83

3.5.1. Geräte und Materialien 83

3.5.2. Chemikalien 84

3.5.3. Präparation der KI-Ozonfilter 84

4. **Anwendung der beschriebenen Verfahren auf die Analyse von Außenluft** 85

5. **Zusammenfassung** 95

6. **Literaturverzeichnis** 97

Abkürzungsverzeichnis

A.D.	Außendurchmesser
ADH	Alkoholdehydrogenase
AlDH	Aldehyddehydrogenase
AO	Alkoholoxidase
c	Konzentration
d	Wanddicke
D	Durchmesser
EtOH	Ethanol
FE	Fluoreszenzeinheiten
FIA	Fließinjektionsanalyse
HPLC	High-Performance Liquid Chromatographie (High-Pressure Liquid Chromatographie)
I.D.	Innendurchmesser
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
l	Länge
li	liquid
m	Meter
MeOH	Methanol
n	Anzahl der Messungen
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NWG	Nachweisgrenze
ODS	Octadecylsilan
p-HPES	para-Hydroxyphenylessigsäure
POD	Peroxidase
Q	Flußrate
r	Korrelationskoeffizient
RP	Reversed-Phase
RT	Raumtemperatur
s	Präzision
S_{eff}	Sammeleffizienz
t	Zeit
T	Temperatur
V	Volumen

1. Einleitung

Ethanol war in Form alkoholischer Getränke schon in vorgeschichtlicher Zeit bekannt. Eine ca. 5100 bis 5500 Jahre alte sumerische Keilschrift beschreibt bereits die Bierherstellung, und seit dem 3. Jt. wurden in Mesopotamien schon zahlreiche Biersorten gebraut, während in Italien und Griechenland zu diesem Zeitpunkt die Weinherstellung weit verbreitet war [1].

Methanol spielte dagegen bis in die Neuzeit keine besondere Rolle. Es wurde von R. Boyle erstmals im Jahre 1661 bei der Destillation von Holz gefunden (Holzgeist). Die Aufklärung von Zusammensetzung und Struktur gelangen allerdings erst J. v. Liebig und J. B. A. Dumas unabhängig voneinander im Jahre 1835 [2].

In der Natur kommen die Alkohole frei oder in Form ihrer Ester vor, z. B. in gegorenen Fruchtsäften, in Fetten (Glycerin) oder in ätherischen Ölen (Menthol) [1]. Verwendung finden sie als Lösungs- und Reinigungsmittel, in der Farbindustrie und als Extraktionsmittel [1].

Als Treibstoffe bzw. Treibstoffzusätze haben Methanol und Ethanol seit den 70iger Jahren in einigen Ländern Bedeutung erlangt. Einerseits, um die Abhängigkeit von ölexportierenden Ländern zu mildern, andererseits, um langfristig die knapper werdenden Ressourcen an fossilen Brennstoffen ersetzen zu können [1]. Durch die Verwendung von Ethanol als Treibstoff wurde in den letzten 20 bis 30 Jahren die Diskussion über regenerierbare Rohstoffe forciert [3]. Ethanol wird nahezu ausschließlich durch Vergärung von Zuckerrohr, aus der Stärke von Getreide und Mais und aus Melasse oder Cellulose gewonnen [1], Methanol dagegen ist aus Erdgas und Kohle zu synthetisieren [4-6]. In jüngster Zeit wurden Brennstoffzellen auf Methanolbasis entwickelt und für den Einsatz in Elektrofahrzeugen erprobt [3].

In vielen Ländern werden breit angelegte Forschungs- bzw. Erprobungsprogramme für den Einsatz von Alkoholkraftstoffen durchgeführt. In Frankreich z. B. beteiligten sich eine Reihe von Fahrzeug- und Mineralölherstellern am “Carburol-Programm“, das in einer ersten Phase mit mehreren hundert Fahrzeugen die Benutzung von Alkohol-Benzin-Mischkraftstoffen auf der Basis von Methanol und Ethanol und höheren Alkoholen erprobt.

Vorgesehen sind zunächst Beimischungen von wenigen Prozent, die später auf etwa 10 % Alkoholanteil erhöht werden sollen [3]. In den USA wird unter dem Namen “ Gasohol “ ein unverbleiter Ethanol-Benzin-Kraftstoff vertrieben, der 10 % Ethanol enthält. Hierbei wird die Verwendung von Mischkraftstoffen verschiedener Zusammensetzung sowie von Reinethanol bzw. Methanolkraftstoff getestet. Besonders der Staat Kalifornien unternimmt erhebliche Anstrengungen, um durch den Einsatz von Alkoholkraftstoffen die Probleme mit der Luftverschmutzung zu reduzieren [3].

Das Proálcool-Programm der brasilianischen Regierung war in erster Linie eine Reaktion auf die Ölpreiskrise von 1973, in der sich die Weltmarktpreise für Rohöl vervierfacht hatten [7]. Das im Oktober 1975 gestartete Programm sah die Substitution von Benzin durch heimisches Ethanol vor. Dieser durch Vergärung von Zuckerrohr gewonnene Alkohol sollte gleichzeitig die gefallenen Weltmarktpreise für Zucker aufwerten. Bereits 1979 wurde die jährliche Produktion von Ethanol auf 3 Mrd. Liter gesteigert, das hauptsächlich als Zusatz zum Benzin (ca. 22 Vol%) genutzt wurde. Die Irankrise Ende 1978 und die darauf folgende zweite Ölpreiserhöhung der OPEC im Juni 1979 waren Argumente für den Ausbau des Alkoholprogramms. Im sog. Programm zur Energiemobilisierung wurden spezielle Alkoholfahrzeuge mit modifizierten Otto-Motoren in den Markt eingeführt. Diese Fahrzeuge werden ausschließlich mit ca. 90 %igem Ethanol betrieben [7].

In Tab. 1 ist der Anteil ethanolbetriebener Fahrzeuge an den Neuzulassungen von 1979 bis 1991 in Brasilien gezeigt.

Jahr	Anteil der Neuzulassungen / %
1979	0,3
1980	28,5
1981	28,7
1982	38,1
1983	88,5
1984	94,6
1985	96,0
1986	92,1
1987	94,4
1988	88,4
1989	61,7
1990	11,6
1991	19,6

Tab. 1: Anteil der mit Ethanol betriebenen Fahrzeuge an den Neuzulassungen in Brasilien [7]

Der Anteil dieser Automobile an den Neuzulassungen nahm hierbei von 1979 bis 1985 kontinuierlich zu und blieb bis 1987 annähernd konstant. Von 1988 bis 1991 ist eine starke Abnahme dieser Quote zu verzeichnen. Diese ist mit der Stabilisierung des Ölpreises und der gesteigerten Versorgung Brasiliens mit Erdöl zu begründen.

Der gegenwärtige Welt-Mineralölverbrauch liegt bei ca. 3 Milliarden Tonnen/Jahr, wovon ca. 1/3 auf den Straßenverkehrssektor in Form von Benzin oder Dieselöl fallen. Die Weltmethanolproduktion beträgt ca. 12 Millionen Tonnen/Jahr und liegt damit hinsichtlich des Energiegehaltes um mehr als zwei Zehnerpotenzen niedriger, während die Produktion von agrarischem Ethanol mit ca. 4 Millionen Tonnen/Jahr noch erheblich geringer ausfällt. Eine Substitution des heutigen Transportkraftstoffs durch Alkoholkraftstoffe könnte, wenn überhaupt, nur langfristig in einem zeitlichen Rahmen von 20 bis 30 Jahren realisiert werden. Hieraus würden allerdings, allein wegen des riesigen Landbedarfs, ganz neue Probleme erwachsen [3].

Bei der Verwendung von Ethanol und auch von Methanol als Kraftstoff bzw. Zusatzstoff findet man andere Verbrennungsprodukte als bei der Verwendung von fossilen Energieträgern [8-10]. Die unterschiedliche Abgaszusammensetzung hat insbesondere in Ballungsräumen einen erheblichen Einfluß auf die Atmosphärenchemie. Der Reduzierung von Kohlenmonoxid und Stickoxiden in den Abgasen steht hierbei eine Zunahme an Aldehyden gegenüber [11]. Darüberhinaus sind in Autoabgasen auch erhebliche Mengen unverbrannter Alkoholanteile zu finden [11,12].

In den Vereinigten Staaten wurden Abgasuntersuchungen mit Kraftstoffen durchgeführt, die 100 % (M 100) und 85 % (M 85) Methanol enthielten [13]. Der Anteil an Kohlenmonoxid, Kohlenwasserstoffen, Stickoxiden, Methanol und Formaldehyd im Abgas ist in Tab. 2 angegeben.

Emission bei T = 21 °C / g/km

	M 100	M 85
CO	5,63	4,38
HC	0,13	0,31
NO_x	0,38	0,44
CH_3OH	1,13	0,63
CH_2O	0,21	0,08

Tab 2: Abgasmessungen an einem Fahrzeug (Ford Escort), dessen Kraftstoff verschiedene Methanolanteile (M 85 bzw. M 100) enthielt [13]

In diesen Abgasen ist noch ein beträchtlicher Anteil unverbrannten Methanols zu finden. Die Stickoxidbelastung ist mit 0,38 (M 100) und 0,44 g/km (M 85) im Vergleich zu mit Benzin betriebenen Motoren gering.

Abb. 1 zeigt den Vergleich des Emissionsverhaltens von mit reinem Ethanol betriebenen Motoren mit den entsprechenden Werten eines mit Benzin betriebenen Motors [nach 3].

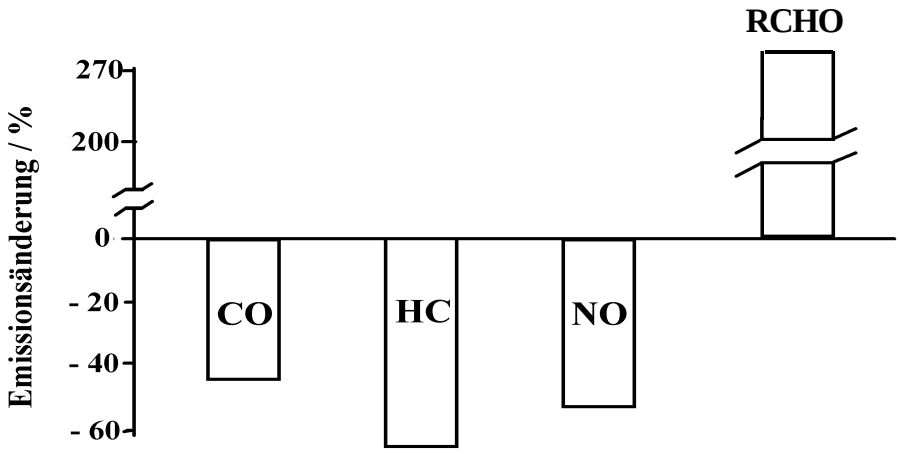

Abb.1: Emissionsänderungen für den Gebrauch von Ethanol als Kraftstoff (Werte sind auf einen mit Benzin betriebenen Motor bezogen) [3].

Hieraus ist deutlich eine Abnahme der Emissionen von Kohlenmonoxid um 40 %, der Kohlenwasserstoffe um 60 % und der Stickoxide um 50 %, sowie ein Anstieg der Formaldehydemission um 270 % zu erkennen.

Von der Confederaçãо Nacional do Petróleo (CNI) in Brasilien wurden 1983 und 1989 Abgasmessungen an Fahrzeugen durchgeführt, die mit einem Ethanol/Benzin-Treibstoffgemisch (22/78Vol%) und mit reinem Ethanol betrieben wurden [7].

Die dabei gefundenen Emissionen an Kohlenmonoxid, Kohlenwasserstoff und Stickoxiden sind in Tab. 3 aufgeführt.

Emissionen / g/km

	CO	HC	NO_x
reiner Ethanolkraftstoff (1983)	18,0	1,6	1,0
Benzinkraftstoff mit 22 Vol% Ethanolzusatz (1983)	33,0	3,0	1,4
reiner Ethanolkraftstoff (1989)	12,8	1,6	1,1
Benzinkraftstoff mit 22 Vol% Ethanolzusatz (1989)	15,2	1,6	1,6

Tab. 3: Emissionswerte von mit unterschiedlichem Treibstoff betriebenen Fahrzeugen (Saõ Paulo/Brasilien) [7]

Aus den Ergebnissen von 1983 ist zu sehen, daß die Verwendung von reinem Ethanol im Vergleich zu einem Ethanol/Benzin-Kraftstoffgemisch zu einer Reduzierung der Emissionen von Kohlenmonoxid und Kohlenwasserstoffen um ca. 50 % führte. Der Ausstoß an Stickoxiden nahm um ca. 30 % ab. Aufgrund des stärkeren technischen Fortschritts im Motorenbau lag 1989 der Unterschied in der Kohlenmonoxidemission nur noch bei etwa 16 %. Bei der Kohlenwasserstoffemission konnte praktisch kein Unterschied mehr festgestellt werden. Der Unterschied bei den Stickoxidemissionen lag wiederum bei ca. 30 % [7].

1.1. Vorkommen von Methanol und Ethanol in der Atmosphäre

Über die Konzentrationen der beiden Alkohole in der Atmosphäre sind bisher nur wenige Daten veröffentlicht. So wurden bei Luftmessungen in der Arktis im Sommer 1967 1,2 ppb_v Gesamtalkohol ermittelt [14]. E. Lahman et al. [15] führten 1977 Luftmessungen in West-Berlin durch und fanden Konzentrationen von 3-59 ppb_v Methanol und 1,1-68,2 ppb_v Ethanol. Messungen über dem Pazifischen Ozean, von H. B. Singh et al. [16] im Frühjahr 1994 durchgeführt, ergaben für Methanol und Ethanol eine Nachweisgrenze von ca. 10 ppt_v. Im Jahre 1982 führten J. R. Snider et al. [17] in Tucson, Arizona Alkoholmessungen durch und ermittelten mittels Gas-Reduktions-Detektor Konzentrationen von 200 ppb_v Methanol und 150 ppb_v Ethanol. Ferner ergaben in der Nähe von Garmisch-Partenkirchen gaschromatographische Messungen 29 ppt_v Ethanol und 56 ppt_v Methanol [18].

Als natürliche Quellen für Alkohole können verschiedene Pflanzen auftreten, z. B. sind Heracleumfrüchte, Baumwollpflanzen, Sojabohnen und bestimmte Gräser in der Lage, Methanol zu emittieren [19]. Dies ist auf die Demethylierung von Pektin mit Hilfe des Enzyms Pectinmethylesterase zurückzuführen. Für Sojabohnen wurden Emissionsraten von 18,1 ± 3 µg Methanol/h bezogen auf ein Gramm Trockengewicht ermittelt [19]. Ethanol ist überall dort zu finden, wo zucker- oder stärkehaltige Substanzen durch Hefezellen vergoren werden, z. B. in verfaulendem Fallobst [1].

Als wichtigster Bildungsprozess für Methanol und Ethanol in der Atmosphäre gilt der radikalische Abbau der entsprechenden Kohlenwasserstoffe Methan und Ethan [20-25].

$$CH_4 + HO\cdot \xrightarrow{k_1} \cdot CH_3 + H_2O \qquad (1)$$

$$\cdot CH_3 + HO\cdot \xrightarrow{k_2} CH_3OH \qquad (2)$$

Ganz analog verläuft die Reaktion für Ethan. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten sind [24]:

k_1 (CH_4) = $8 \cdot 10^{-15}$ $cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT
k_1 (C_2H_6) = $2{,}7 \cdot 10^{-13}$ $cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$;RT

Eine indirekte natürliche Quelle für Methanol stellen auch die Ozeane dar [26]. Methanol ist ein Abbauprodukt des Methyliodids, das aus Seewasser emittiert wird.

1.2. Reaktionen der Alkohole in der Atmosphäre

Wie bei der überwiegenden Zahl der organischen Verbindungen ist die radikalische Oxidation der wichtigste Abbaumechanismus von Alkoholen in der Atmosphäre [20-22]. Dabei kann es neben einer Hydroxylradikal-Konversion auch zu einer NO-NO_2-Konversion und damit zur Ozonbildung kommen (siehe Gl. 7-9) [27,28].

$$CH_3\text{-}OH + HO\cdot \xrightarrow{k_3} \cdot CH_2OH + H_2O \quad (3)$$

$$\cdot CH_2OH + O_2 \longrightarrow \cdot CH_2(O_2)OH \quad (4)$$

$$\cdot CH_2(O_2)OH \longrightarrow CH_2O + HO_2\cdot \quad (5)$$

$$CH_3\text{-}OH + HO\cdot + O_2 \longrightarrow CH_2O + HO_2\cdot + H_2O \quad (6)$$

$$HO_2\cdot + \cdot NO \longrightarrow \cdot NO_2 + HO\cdot \quad (7)$$

$$\cdot NO_2 + h \cdot \nu \longrightarrow \cdot NO + O \quad (8)$$

$$O + O_2 \longrightarrow O_3 \quad (9)$$

Analog verläuft die Reaktion für Ethanol. Die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten betragen [25]:

$k_3\,(CH_3OH) = 0{,}64 \pm 0{,}06 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

$k_3\,(C_2H_5OH) = 2{,}25 \pm 0{,}22 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

Die Menge des entstehenden Ozons ist dabei unter anderem vom Verhältnis an Stickstoffdioxid zu Stickstoffmonoxid und Alkohol zu Aldehyd abhängig.

Eine weitere Möglichkeit der Ozonbildung ist die Reaktion von Aldehyden mit Peroxyradikalen [29].

$$CH_2O + HO_2\cdot \xrightarrow{k_4} \cdot O_2H\text{-}CHOH \quad (10)$$

$$\cdot O_2H\text{-}CHOH + \cdot NO \longrightarrow \cdot OH\text{-}CHOH + \cdot NO_2 \quad (11)$$

$$\cdot NO_2 + h \cdot \nu \longrightarrow \cdot NO + O \quad (8)$$

$$O + O_2 \longrightarrow O_3 \quad (9)$$

Y. Akutsu et al. [30] errechneten anhand von Modellen die Ozonkonzentrationen bei verschiedenen Alkohol/Aldehyd-Zusammensetzungen und konstanten Stickoxid-konzentrationen in der Luft. Für das System Methanol/Formaldehyd und Ethanol/Acetaldehyd erhielten sie folgende Mischungsverhältnisse:

Verhältnis Alkohol/Aldehyd	nur Alkohol	1,5/ 0,5	1,0/ 1,0	0,5/ 1,5	nur Aldehyd
c O_3 / ppb_v für Methanol/Formaldehyd	3	12	36	183	519
c O_3 / ppb_v für Ethanol/Acetaldehyd	6	116	392	626	824

Tab. 4: Ozonkonzentrationen, errechnet für verschiedene Alkohol/Aldehydverhältnisse [30]
$c(NO) = 900\ ppb_v$; $c(NO_2) = 100\ ppb_v$
$c(\text{Alkohol} + \text{Aldehyd}) = 2000\ ppb_v$

Ein Anstieg der Ozonkonzentration ist hiernach bei einem hohen Aldehyd-Anteil zu erwarten, da, wie folgende Daten verdeutlichen, die Aldehyde eine höhere Reaktivität im Vergleich zu den Alkoholen besitzen.

$k_3\,(CH_3OH) = 0{,}64 \pm 0{,}06 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

$k_3\,(C_2H_5OH) = 2{,}25 \pm 0{,}22 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

$k_4\,(CH_2O) = 9{,}77 \pm 0{,}06 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

$k_4\,(CH_3CHO) = 15{,}80 \pm 0{,}22 \cdot 10^{-12}\ cm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$; RT

Der weitere Abbau der zunächst gebildeten Aldehyde kann bei Formaldehyd zur Ameisensäure führen [31].

$$CH_3\text{-}OH + HO\cdot + O_2 \rightarrow CH_2O + HO_2\cdot + H_2O \qquad (6)$$

$$CH_2O + HO_2\cdot \rightarrow \cdot O_2H\text{-}CHOH \qquad (10)$$

$$\cdot O_2H\text{-}CHOH + HO_2\cdot \rightarrow H\text{-}COOH + O_2 + H_2O \qquad (12)$$

Ein anderer Reaktionsweg läuft über die Photolyse von Formaldehyd [32].

$$CH_2O + h \cdot \nu \rightarrow \cdot CHO + H\cdot \quad (13)$$

$$\cdot CHO + O_2 \rightarrow HO_2\cdot + CO \quad (14a)$$

$$H\cdot + O_2 \rightarrow HO_2\cdot \quad (14b)$$

$$CH_2O + h \cdot \nu + 2O_2 \rightarrow 2HO_2\cdot + CO \quad (15)$$

Analog verläuft die Reaktion für Ethanol.

Acetaldehyd reagiert nach Photolyse mit Sauerstoff. Das dabei entstehende Peroxyacetyl-radikal kann durch anschließende Reaktion mit NO_2 zu Peroxyacetylnitrat (PAN) umgesetzt werden [33,34].

$$CH_3\text{-}CH_2OH + HO\cdot + O_2 \rightarrow CH_3\text{-}CHO + HO_2\cdot + H_2O \quad (16)$$

$$CH_3\text{-}CHO + h \cdot \nu + O_2 \rightarrow CH_3\text{-}COO_2\cdot + H\cdot \quad (17)$$

$$CH_3\text{-}COO_2\cdot + NO_2\cdot \rightarrow CH_3\text{-}COO_2NO_2 \text{ (PAN)} \quad (18)$$

Peroxyacylnitrate sind einerseits NO_2-Speicher, die für den Ferntransport von Stickoxiden verantwortlich sind, andererseits sind sie ausgesprochen phytotoxisch [33,34].

Zur Untersuchung solcher atmosphärenchemischer Zusammenhänge sind unter anderem leistungsfähige Analysenverfahren notwendig.

1.3. Bisher beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Alkoholen in Außenluft

Zur Bestimmung von Alkoholen in gasförmigen Matrices sind bislang nur relativ wenige Analysenmethoden veröffentlich [35-44]. Sie beziehen sich in der Mehrzahl auf die Bestimmung von Ethanol in Atemluft, da hierdurch Rückschlüsse auf die Konzentration an Ethanol in Blut gezogen werden können.

Lange Zeit wurden hierzu bei Polizeikontrollen Atemprüfröhrchen eingesetzt, die ein Chromat-Schwefelsäure-Gemisch auf einem festen Trägermaterial enthielten [35]. Bei Anwesenheit von Ethanol in der Atemluft wird dabei gelbes Dichromat zum grünen Chrom(III)Salz reduziert. Mit den Röhrchen ist man in der Lage, Ethanol in Konzentrationen bis hinab zu 60 ppm_v nachzuweisen. Heute werden die Prüfröhrchen weitestgehend durch Geräte auf Halbleiterbasis oder durch IR-spektroskopische oder elektrochemische Meßmethoden ersetzt [37, 38]. Geräte auf Halbleiterbasis zeichnen sich durch hohe Selektivität, Temperaturbeständigkeit und schnelles Ansprechen auch bei Feuchtigkeitsschwankungen aus und können Methanol und Ethanol bis herunter zu ca. 50 ppb_v nachweisen. Mit elektrochemischen Sensoren, die über eine hohe Spezifität verfügen, sind beide Alkohole bis hinab zu 0,5 ppm_v bestimmbar [36]. Auch in der IR-Spektroskopie sind Sensoren, die über eine lange Lebensdauer und Stabilität verfügen, einsetzbar. Hiermit können Konzentrationen an Methanol und Ethanol bis ca. 25 Vol% nachgewiesen werden.

E. T. Hayes et al. entwickelten ein Verfahren zur direkten und selektiven Bestimmung von Ethanol in der Gasphase [39]. Der gasförmige Alkohol wird in einem Vanadiumoxinat enthaltenden Polyvinylacetatfilm gelöst, der rote Vanadium-Oxinat-Ethanol-Komplex mit Chloroform extrahiert und photometrisch vermessen. Das Verfahren erwies sich als kostengünstig, einfach und selektiv. Nachteile der bisher nur im Labor erprobten Methode lagen in der für die Bestimmung von Ethanol in der Atmosphäre zu hohen Nachweisgrenze von 1200 ppb_v und der geringen Stabilität des Vanadium-Oxinat-Komplexes.

Beschrieben ist auch eine spektralphotometrische Methode für die Bestimmung von Methanol in der Atmosphäre [40]. Der Alkohol wird an Aktivkohle adsorbiert, mit Tetrachlorkohlenstoff eluiert und mit $KMnO_4$ zu Formaldehyd oxidiert. Die Bestimmung des gebildeten Formaldehyds erfolgt photometrisch mit Chromotropsäure.

Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei einer Probenahmezeit von 60 Minuten bei 3,5 ppb_v. Sie verschlechtert sich naturgemäß mit verkürzter Probenahmezeit, so daß dieses Verfahren für empfindliche Messungen mit hoher Zeitauflösung nicht einsetzbar wäre. Weitere Nachteile sind der erforderliche hohe Arbeitsaufwand sowie die Beschränkung auf Methanol.

Bei Y. Maeda et al. [41] ist ein empfindliches und selektives Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Methanol und Ethanol in der Atmosphäre beschrieben. Die gasförmigen Alkohole wurden bei Laborversuchen mit Stickstoffdioxid zu den jeweiligen Alkylnitriten umgesetzt und diese gaschromatographisch mittels ECD (Electron Capture Detection) bestimmt. Mit diesem Verfahren ließen sich ohne Anreicherung Nachweisgrenzen von 3,0 ppb_v für Methanol und 0,6 ppb_v für Ethanol erzielen. Der sicherheitstechnische und apparative Aufwand hierbei ist allerdings sehr hoch, so daß dieses Verfahren für Feldmessungen nur bedingt einsetzbar wäre.

Eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung von Alkoholen in Atem- und Außenluft ist bei T. Qin et al. [42] dargestellt. Die Alkohole werden auf Aktivkohle bzw. Silicagel adsorbiert und nach thermischer Desorption gaschromatographisch getrennt und detektiert. Mit dieser Methode ließen sich Nachweisgrenzen von 0,3 ppb_v für Ethanol und 0,7 ppb_v für Methanol erreichen.

I.-R. Johansen et al. [43] bestimmten mehrere Gase gleichzeitig, unter ihnen Methanol und Ethanol, in Umgebungsluft. So konnten Konzentrationen an Methanol von 5 ppm_v und an Ethanol von 24 ppm_v mittels FT-IR-Spektrometer gemessen werden.

Bei E. A. Druyan [44] ist ein Verfahren zur Messung von Methanol in Luft beschrieben. Es wird in wässriger, saurer Kaliumpermanganatlösung zu Formaldehyd oxidiert und dieses colorimetrisch bestimmt. Die erzielte Nachweisgrenze für Methanol liegt bei 1 ppm_v.

1.4. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es nun, ein empfindliches und selektives Bestimmungsverfahren für Methanol und Ethanol in Außenluft zu entwickeln. Es sollte gerade für Feldmessungen schnell und ohne großen apparativen Aufwand einsetzbar sein. Da bereits zahlreiche Methoden zur Alkoholbestimmung in der flüssigen Phase beschrieben sind, insbesondere für Matrices wie Blut- und Humanseren [45-54], sollte durch Überführung der Alkohole in die Flüssigphase nicht nur ein größeres Repertoire an Methoden ausgeschöpft, sondern auch ein nicht unerheblicher Anreicherungseffekt erzielt werden. Im Hinblick auf deren zu erwartende Selektivität sollte die Anwendung enzymatischer Reaktionen im Vordergrund stehen. (Dies ist auch Gegenstand eines EU geförderten Projektes, zusammen mit brasilianischem Partner)

2. Untersuchungen zur Trennung und Bestimmung von Alkoholen in wässrigen Proben auf Basis enzymatischer Reaktionen

Die enzymatische Analyse ist schon seit Mitte des vorigen Jahrhunderts bekannt. G. Osann wies 1845 Wasserstoffperoxid mit Hilfe von Peroxidase nach [55]. Um 1850 fand Louis Pasteur, daß die Umwandlung von Zucker zu Alkohol durch Hefe mit Hilfe von Fermenten, später Enzyme genannt, katalysiert wird [56]. Erst Eduard Buchner gelang 1897 die Extraktion eines dieser Enzyme in löslicher, aktiver Form [56]. Diese Entdeckung bewies, daß enzymkatalysierte Stoffwechselreaktionen auch unabhängig von lebenden Zellen ablaufen. Das erste enzymatisch wirkende Protein, die Urease, wurde 1926 von James Sumner aus Extrakten einer Bohnenart in reiner, kristalliner Form isoliert [56]. Es folgte eine intensive Forschung auf dem Gebiet der enzymatischen Reaktionen. Bis heute sind etwa 2000 verschiedene Proteine als Enzyme identifiziert worden, von denen jedes eine andere chemische Reaktion katalysiert. Durch die außerordentliche Entwicklung der Enzymchemie während der letzten Jahrzehnte konnten zahlreiche enzymatische Analysenverfahren Eingang in die klinische Chemie, Lebensmittelchemie, Pharmazie etc. finden. Die besonderen Eigenschaften dieser Biokatalysatoren ermöglichen einen selektiven, häufig spezifischen, und empfindlichen Nachweis verschiedener Spezies. Seiner biologischen Funktion entsprechend katalysiert ein bestimmtes Enzym meist nur eine ganz bestimmte Reaktion, Nebenreaktionen können somit weitgehend vermieden werden [56-61].

2.1. Oxidation von Methanol und Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase zu den jeweiligen Aldehyden

Sowohl Methanol als auch Ethanol können durch das Enzym Alkoholoxidase (AO) zu Form- bzw. Acetaldehyd umgesetzt werden. Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid gebildet [56,58,60,61].

$$R\text{-}CH_2OH + O_2 \xrightarrow{AO} R\text{-}CHO + H_2O_2 \qquad (19)$$

Alkoholoxidase gehört zu den Oxidoreduktasen, Enzymen, die Redox-Prozesse katalysieren. Dabei werden Wasserstoff oder Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, der so zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Ermöglicht wird dieser Mechanismus durch die an das Enzym gekoppelte prosthetische Flavin(Isoalloxazin)-Gruppe, die pro Molumsatz zwei Elektronen und Protonen aufnehmen kann [61].

2.1.1. H_2O_2-Detektion durch luminometrische Verfahren

Wie eingangs erwähnt, führt die enzymatische Alkoholoxidation zur äquimolaren Bildung von Wasserstoffperoxid. Mittels dieser reaktiven Spezies lassen sich einige empfindliche Methoden zur indirekten Alkoholbestimmung einsetzen. Dies sind meist luminometrische Verfahren, bei denen die Intensität einer emittierten Strahlung mit der Konzentration der zu bestimmenden Spezies korreliert [62-78]. Dabei unterscheidet man chemiluminometrische von fluorimetrischen Verfahren.

2.1.1.1. Bestimmung durch Chemilumineszenz und Untersuchung der Arbeitsparameter

Die Chemilumineszenz stellt einen Spezialfall der Lumineszenz dar. Tritt sie in der belebten Natur auf, spricht man auch von Biolumineszenz. Mit ihr umschreibt man Prozesse, bei denen ein Teil der Energie einer chemischen Reaktion in Form von Licht abgegeben wird [79]. Dieses Phänomen ist in der belebten Natur weit verbreitet und seit langem dokumentiert [80]. R. Boyle, R. Dubois u.a. beschrieben die Faszination von selbstleuchtenden Organismen wie Bakterien, Pilzen, Quallen, Korallen und Käfern [78]. 1877 synthetisierte B. Radziszewski Lophin (2,4,5-Triphenylimidazol), die erste künstlich hergestellte organische Verbindung, die bei Reaktion mit Sauerstoff in alkalischer Lösung grünes Licht emittiert [81].

Der Lumineszenz muß ein exothermer Prozeß zugrunde liegen, der einen Energiebetrag, bezogen auf Lichtquanten, zwischen 168 und 294 kJ/mol liefert. Ein Teil dieser Energie kann, anders als üblicherweise der Fall, anstatt in Wärme überzugehen Valenzelektronen in einen angeregten Zustand gleicher Multiplizität überführen [78]. Dies ist meist ein Singulettzustand, dessen Rückkehr in den Grundzustand zu einer Lichtemission führen kann.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid durch Chemilumineszenz bietet die langsam ablaufende Reaktion von H_2O_2 mit Luminol (3-Aminophthal-Hydrazid). Übergangsmetallkomplexe wie die von Fe(III), Cu(II) und Co(II) wirken als Aktivatoren, wobei sie sowohl die Zersetzung von Wasserstoffperoxid katalysieren als auch als Cooxidantien fungieren [71,73].

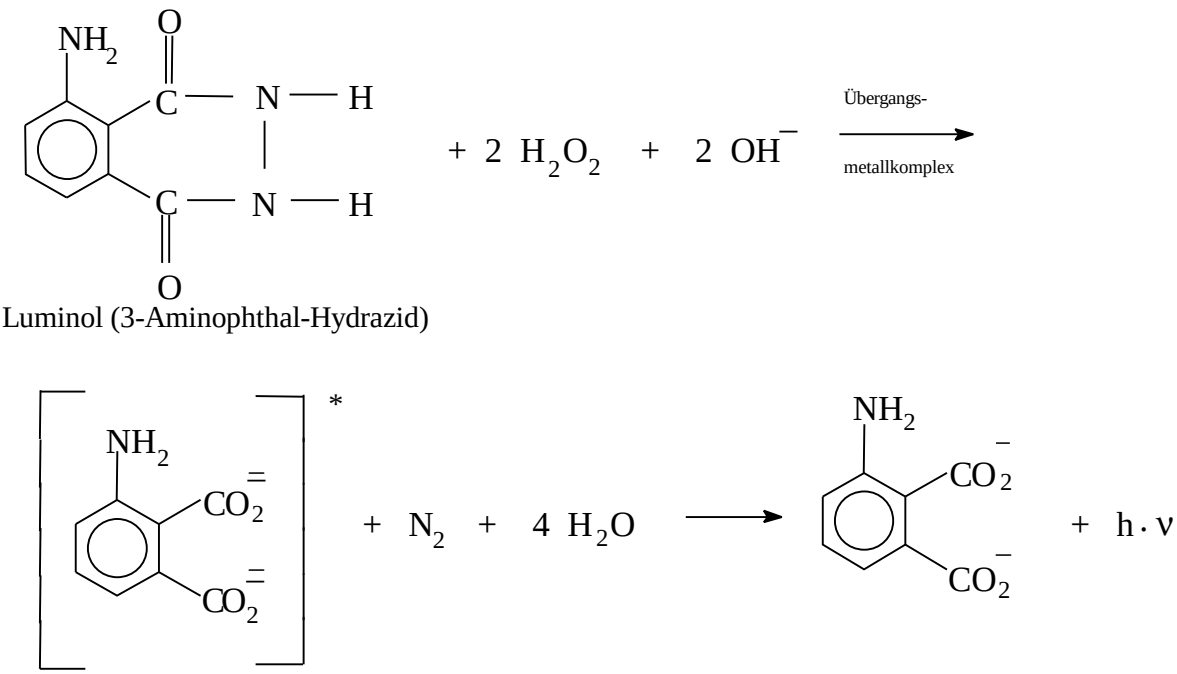

Abb. 2: Oxidationsschema für Luminol [73]

Bei der Rückkehr des angeregten Aminophthalat-Dianions in den Grundzustand wird Strahlung mit einer Wellenlänge von λ = 425 nm emittiert [73].

In den folgenden Untersuchungen galt es, die Bedingungen für diese H_2O_2-Luminol-Reaktion auf die speziellen Analysenanforderungen hin zu optimieren. Die Untersuchungen wurden nach Art einer Fließinjektionsanalyse durchgeführt, wie sie schematisch in Abb. 3 gezeigt ist.

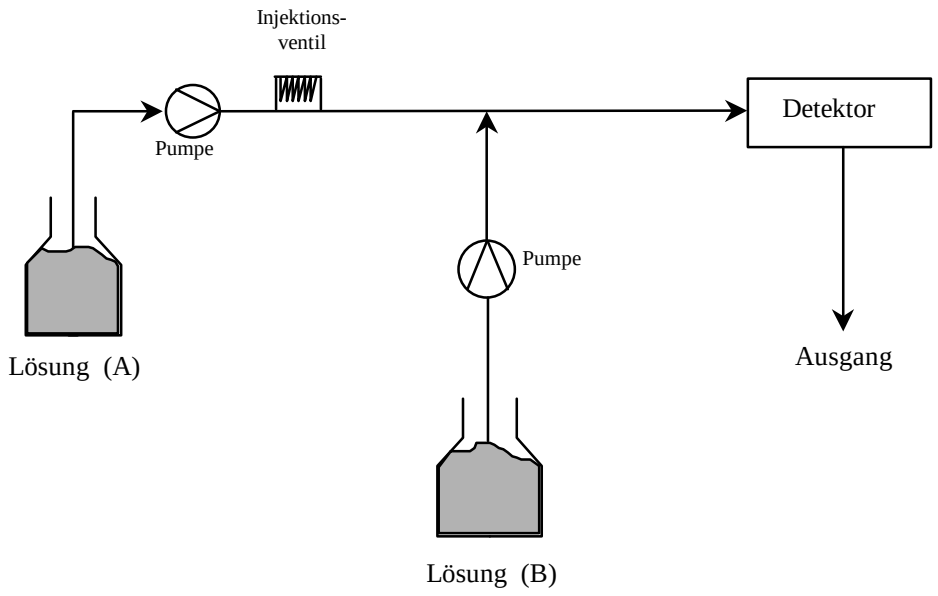

Abb. 3: Schema der Fließinjektionsanalyse. Lösung (A): Puffer (c(Glycin) = 0,1 mol/L; c(NaCl) = 0,1 mol/L; c(NaOH) = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenzlösung (Luminol; $CuSO_4$)

Die Injektion der gepufferten H_2O_2-Standardlösungen (c = 0,5 µmol/L - 0,1 mmol/L) erfolgt in den Lösungsstrom (A). Die beiden Flüssigkeitsströme (A) und (B) werden in einer Mischkammer zusammengeführt und passieren anschließend eine Glas-Wendel, die abgeschirmt gegen äußeres Licht direkt vor dem Photomultiplier angebracht ist. Das durch die Reaktion von H_2O_2 mit Luminol entstehende Licht wird vom Photomultiplier gemessen und ist der H_2O_2-Konzentration direkt proportional.

Folgende Parameter wurden variiert:

- die Luminolkonzentration
- die $CuSO_4$-Konzentration
- der pH-Wert
- die Flußraten

Die Ergebnisse der Variation der Luminolkonzentration sind in Abb.4 dargestellt.

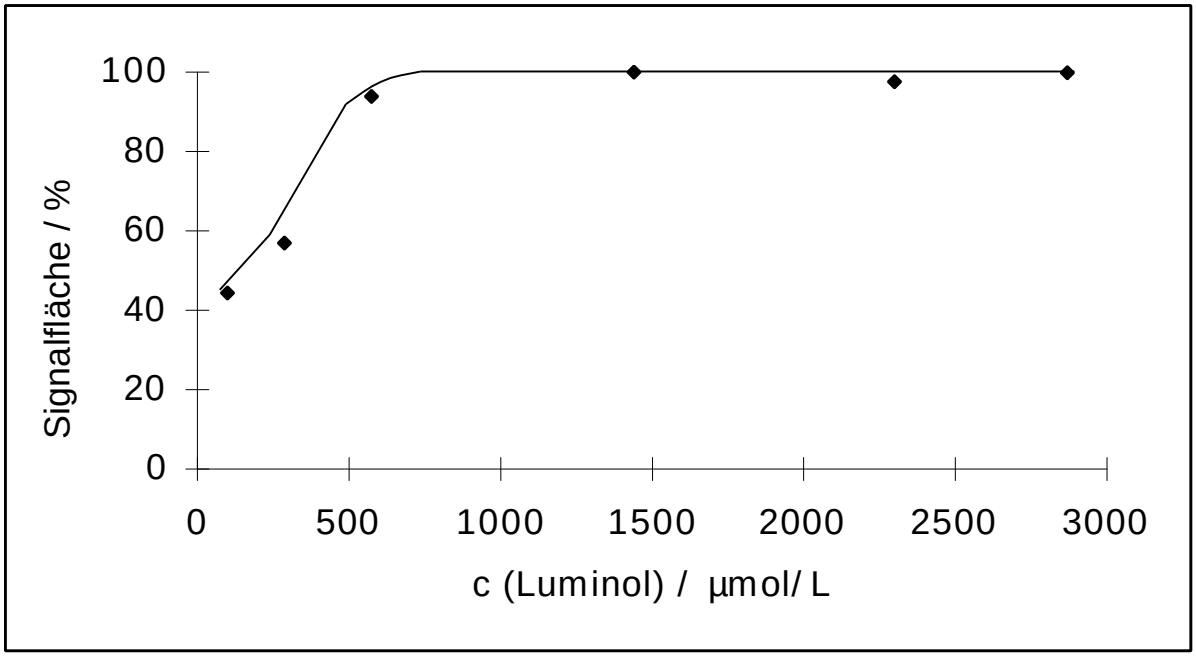

Abb. 4: Abhängigkeit der Signalfläche von der Luminolkonzentration. Lösung (A): Puffer(c(Glycin) = 0,1 mol/L; c(NaCl) = 0,1 mol/L; c(NaOH) = 0,1 mol/L); Q(A) = 1,1 mL/min; Lösung (B): Reagenz (Luminol; c ($CuSO_4$) = 200 µmol/L); Q(B) = 0,6 mL/min; c (H_2O_2) = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 12,0; maximale Signalfläche = 100 %

Es ist zu sehen, daß bis zu einer Luminolkonzentration von ca. 600 µmol/L das Signal stetig ansteigt, bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration jedoch keine Signaländerung mehr zu beobachten ist. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Luminolkonzentration von 2300 µmol/L gewählt, das Reagenz unter Berücksichtigung der gewählten Flüsse also etwa in 1000 fachem Überschuß gegenüber H_2O_2 zudosiert.

Als Katalysator diente $CuSO_4$. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse der Variation der $CuSO_4$-Konzentration, das der Luminollösung zugemischt wurde. In alkalischer Lösung bildet sich ein löslicher $Na_2[Cu(OH)_4]$-Komplex, der die Reaktion katalysiert [82].

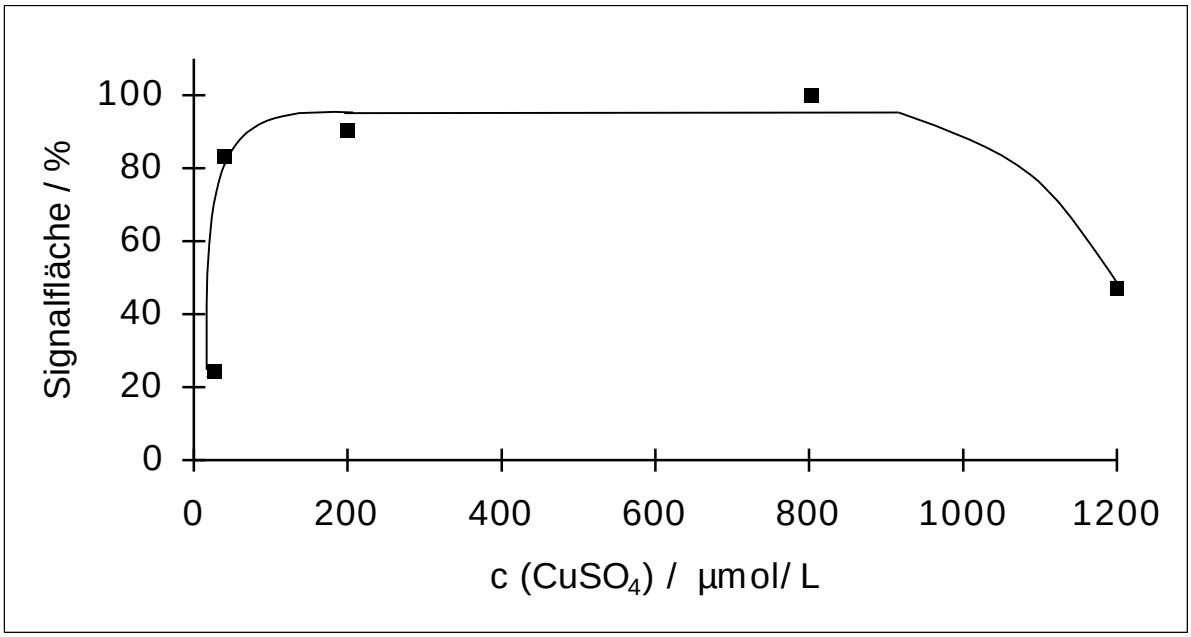

Abb.5: Abhängigkeit der Signalfläche von der $CuSO_4$-Konzentration. Lösung (A): Puffer(c(Glycin) = 0,1 mol/L; c(NaCl) = 0,1 mol/L; c(NaOH) = 0,1 mol/L); Q(A) = 1,1 mL/min; Lösung (B): Reagenz ($CuSO_4$; c(Luminol) = 2300 µmol/L); Q(B) = 0,6 mL/min; c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 12,0; maximale Signalfläche = 100 %

Das Signal steigt bis zu einer $CuSO_4$-Konzentration von 40 µmol/L steil an und bleibt bis zu einer Konzentration von 800 µmol/L annähernd konstant. Bei weiterer Erhöhung der Katalysatorkonzentration ist eine Signalabnahme zu verzeichnen. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher mit einer Konzentration von c ($CuSO_4$) = 800 µmol/L gearbeitet.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, ist die Lichtemission sehr stark vom pH-Wert abhängig. Dieser wurde nach Vermischung von Puffer-, H_2O_2- und Reagenz-Lösung, also am Ausgang der Glas-Wendel, gemessen.

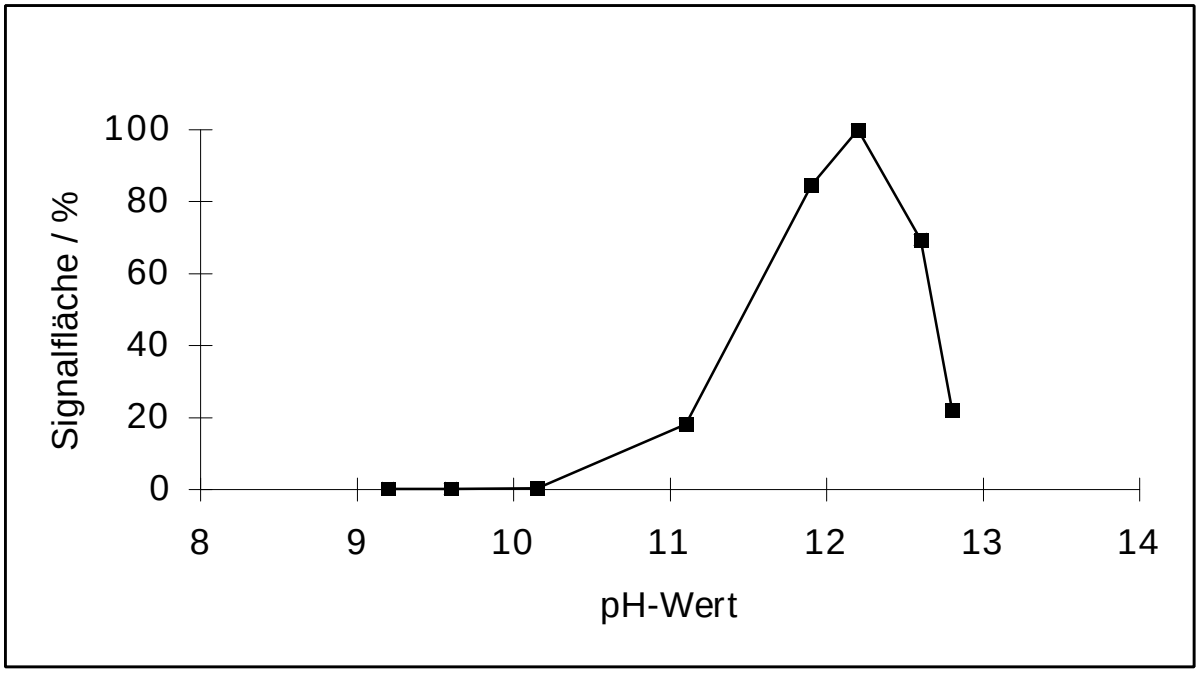

Abb.6: Abhängigkeit der Signalfläche des Chemilumineszenzsignals vom pH-Wert der Gesamtreaktionslösung. Lösung (A): Puffer (Glycin, NaCl, NaOH); pH = 9,0; Lösung (B): Puffer (Glycin, NaCl, NaOH); pH = 10,0–13,25; Reagenz (c(Luminol) = 2300 µmol/L; c($CuSO_4$) = 800 µmol/L); c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; Q(A) = 1,1 mL/min; Q(B) = 0,6 mL/min; maximale Signalfläche = 100 %

Es ist zu erkennen, daß die Reaktion nur in einem pH-Bereich von ca. 10,2 bis 13,0 mit sichtbarer Lichtemission abläuft. Der günstigste pH-Wert liegt bei 12,2. Aus dem steilen Anstieg bzw. Abfall der Signalkurve um den optimalen pH-Wert ist zu entnehmen, daß bereits relativ kleine Abweichungen nicht unerhebliche Signaländerungen hervorrufen. So wird z. B. bei einer Änderung von pH = 12,2 auf pH = 11,8 das Signal um mehr als 20 % reduziert. Daher ist die exakte Einhaltung des pH-Wertes bei dieser Reaktion von großer Bedeutung.

Die Variation der Flußraten an Puffer (A) und Reagenz (B) ist in Abb. 7 dargestellt (s. Abb. 3).

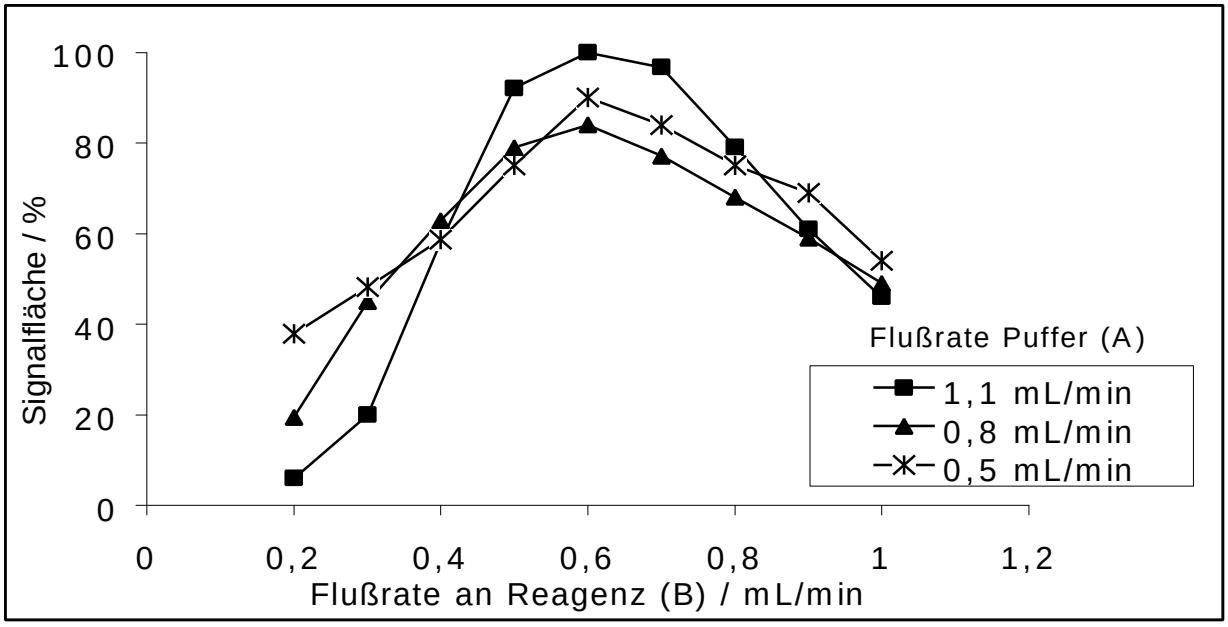

Abb.7: Abhängigkeit der Signalfläche des Chemilumineszenzsignals von den Flußraten an Puffer (A) und Reagenz (B). Lösung (A): Puffer (Glycin, NaCl, NaOH); Lösung (B): Reagenz (c(Luminol) = 2300 µmol/L; c($CuSO_4$) = 800 µmol/L); c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 12,0; maximale Signalfläche = 100 %

Das maximale Signal wird bei einer Flußrate an Puffer (A) von 1,1 mL/min und an Reagenz (B) von 0,6 mL/min erreicht, so daß mit diesen Werten weitergearbeitet wurde.

Unter Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse läßt sich für die chemiluminometrische Detektion von Wasserstoffperoxid unter den gegebenen Bedingungen (c(Luminol) = 2300 µmol/L; c($CuSO_4$) = 800 µmol/L; pH = 12,2) eine Nachweisgrenze von 0,8 µmol/L erzielen.

Ihre Berechnung erfolgte nach H. Kaiser über den Blindwert [83]:

$X_A = X_{Bl} + 3\sigma_{Bl}$

X_A = Signal an der Nachweisgrenze

X_{BL} = Mittelwert der Blindwerte

σ_{Bl} = Standardabweichung des Mittelwertes der Blindwerte

2.1.1.2. Fluorimetrische H_2O_2-Bestimmung

Als Vergleichsmöglichkeit zur Chemilumineszenz-Detektion von Wasserstoffperoxid wurde eine fluorimetrische Bestimmungsmethode untersucht. Hierbei handelt es sich um eine durch Peroxidase katalysierte Reaktion von Wasserstoffperoxid mit p-Hydroxyphenylessigsäure (s. Abb. 8). Das dabei entstehende Dimer kann sehr empfindlich durch Fluoreszenz ($\lambda_{ex.}$ = 286 nm; $\lambda_{em.}$ = 400 nm) bestimmt werden.

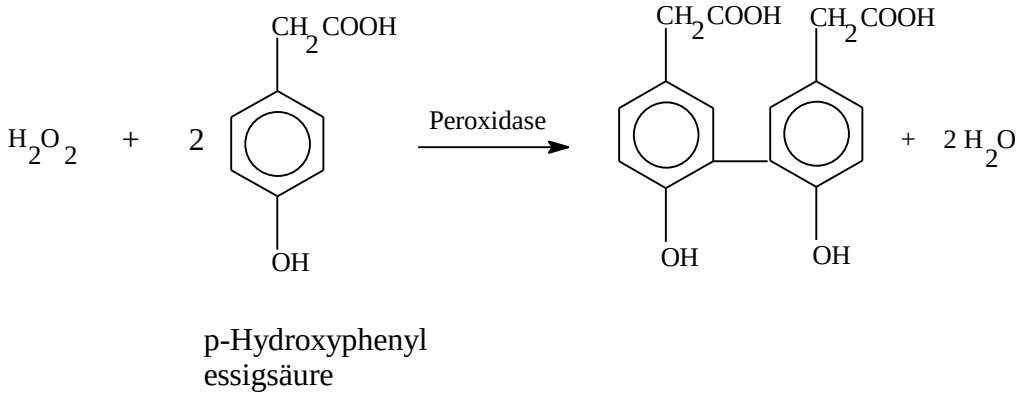

Abb. 8: Oxidationsschema für p-Hydroxyphenylessigsäure [84]

Diese Bestimmung von Wasserstoffperoxid wurde erstmals von G.G.Guilbault beschrieben [84] und in der Folgezeit auch für die Erfassung von H_2O_2 in Niederschlägen [85,86] und in der Gasphase angewendet [87].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den beabsichtigten Einsatz der genannten Methode folgende Parameter untersucht:

- die p-Hydroxyphenylessigsäure(p-HPES)-Konzentration
- die Peroxidase(POD)-Konzentration
- der pH-Wert
- die Flußraten

Die Untersuchungen erfolgten wiederum mit der in Abbildung 3 beschriebenen Fließinjektionsapparatur. Die Lösung (A) war ein 0,1 molarer Phosphatpuffer, die Reagenzlösung (B) ein Gemisch aus Peroxidase- und p-Hydroxyphenylessigsäure-Lösungen. Es wurden H_2O_2-Standardlösungen (c = 0,5 µmol/L - 0,1 mmol/L) in den Volumenstrom (A) injiziert und das resultierende Fluoreszenzsignal nach Vermischung beider Flüsse aufgezeichnet. Da die Reaktion nicht spontan abläuft, wurde ein spezieller, aus Teflon®-Schlauch geflochtener Reaktor (l = 6 m; I. D. = 0,5 mm; V = 1,18 ml) [88] vor den Fluoreszenzdetektor positioniert, so daß Reaktanden und Produkte nach Vermischung zeitversetzt zur Detektion gelangten. Bei den gewählten Flußraten von Q(A) = 0,9 mL/min und Q(B) = 0,4 mL/min betrug die Verweilzeit im Reaktor ca. 55 Sekunden. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der p-HPES-Konzentration ist in Abb. 9 dargestellt.

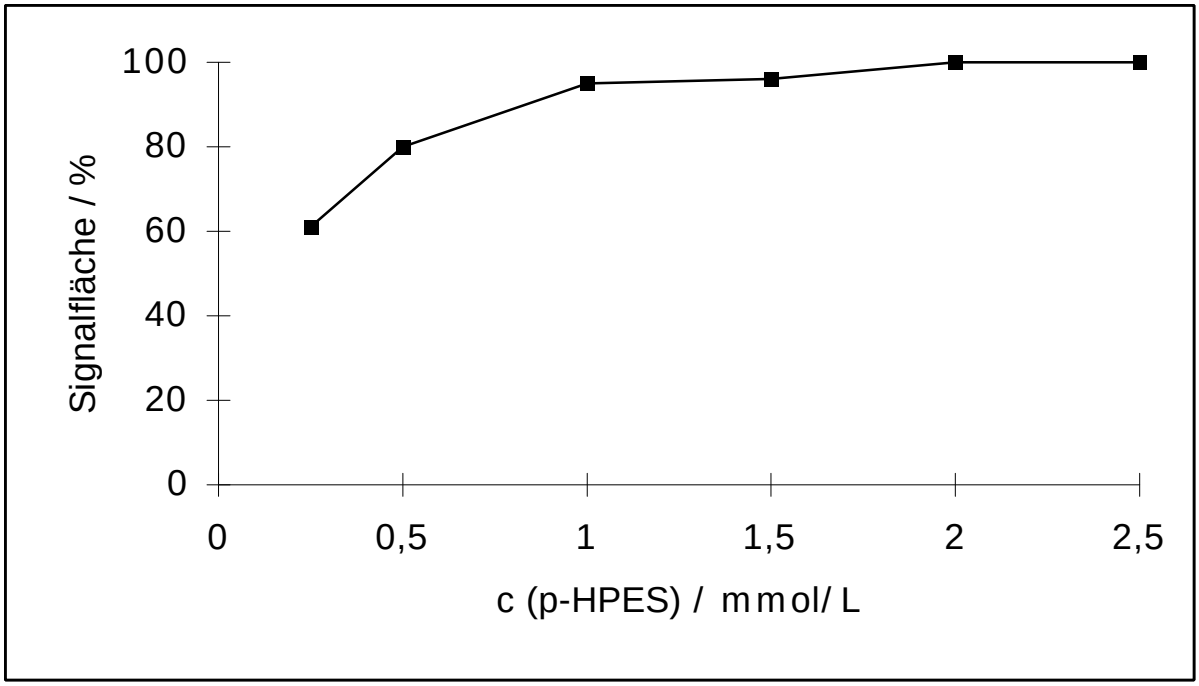

Abb. 9: Abhängigkeit der Signalfläche von der p-Hydroxyphenylessigsäure-Konzentration. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; Lösung (B): Reagenz (c(POD) = 5 U/ml, p-HPES); Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; $c(H_2O_2)$ = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 7,0; maximale Signalfläche = 100 %

Das Fluoreszenzsignal nimmt bis zu einer Reagenzkonzentration von 1 mmol/L zu. Eine weitere Konzentrationserhöhung führt im untersuchten Bereich bis 2,5 mmol/L zu keiner wesentlichen Signalerhöhung mehr. Die weiteren Untersuchungen erfolgten mit einer p-HPES-Konzentration von 2 mmol/L.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Variation der Peroxidasekonzentration, die der p-HPES-Lösung zugemischt wurde, sind in Abb. 10 dargestellt.

1 Enzymeinheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die die Umsetzung von 1 µmol Substrat pro min bei T = 25 °C katalysiert [61].

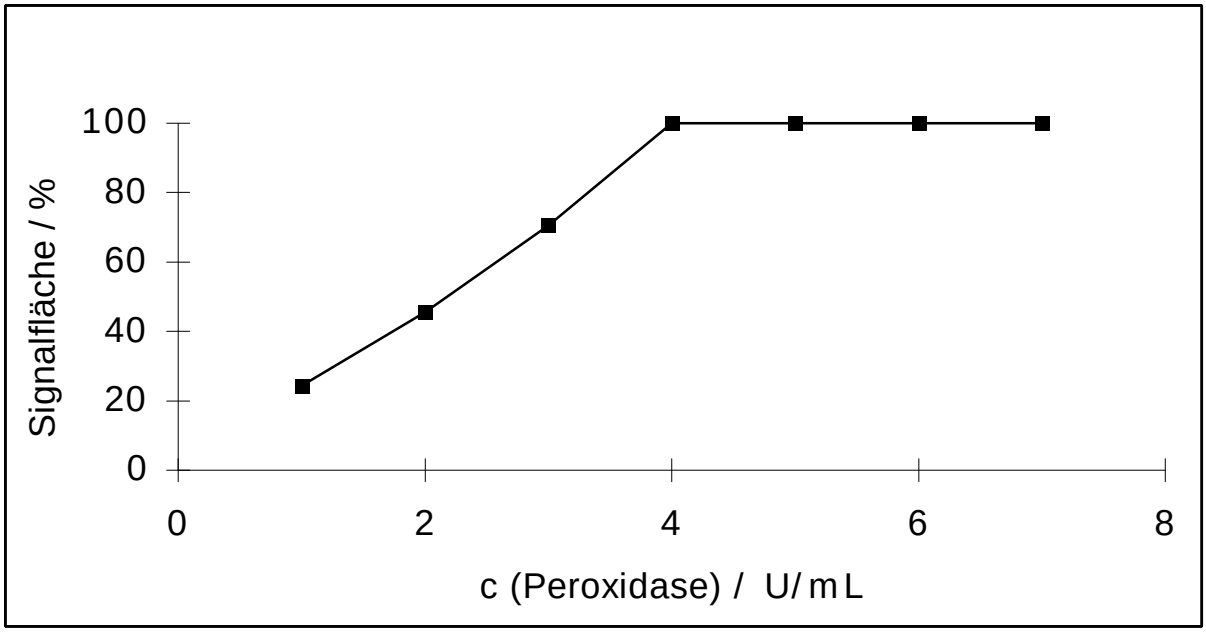

Abb.10: Abhängigkeit der Signalfläche von der Peroxidasekonzentration. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenz (POD; c (p-HPES) = 2 mmol/L); Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 7,0; maximale Signalfläche = 100 %

Bis zu einer Peroxidasekonzentration von c(POD) = 4 U/mL trat eine starke Zunahme des Fluoreszenzsignals auf. Eine weitere Erhöhung der POD-Konzentration hatte keinen Einfluß auf die Umsetzung, so daß für die weiteren Arbeiten eine Enzymkonzentration von mindestens c(POD) = 4 U/ml gewählt werden mußte.

Viele Enzyme zeigen im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich ihre höchste Aktivität. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, in der das relative Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung am Detektorausgang aufgetragen wurde, ist dies auch für die Reaktion mit Peroxidase der Fall, allerdings mit geringer Ausprägung. Das höchste Signal wurde bei pH = 7,4 gefunden.

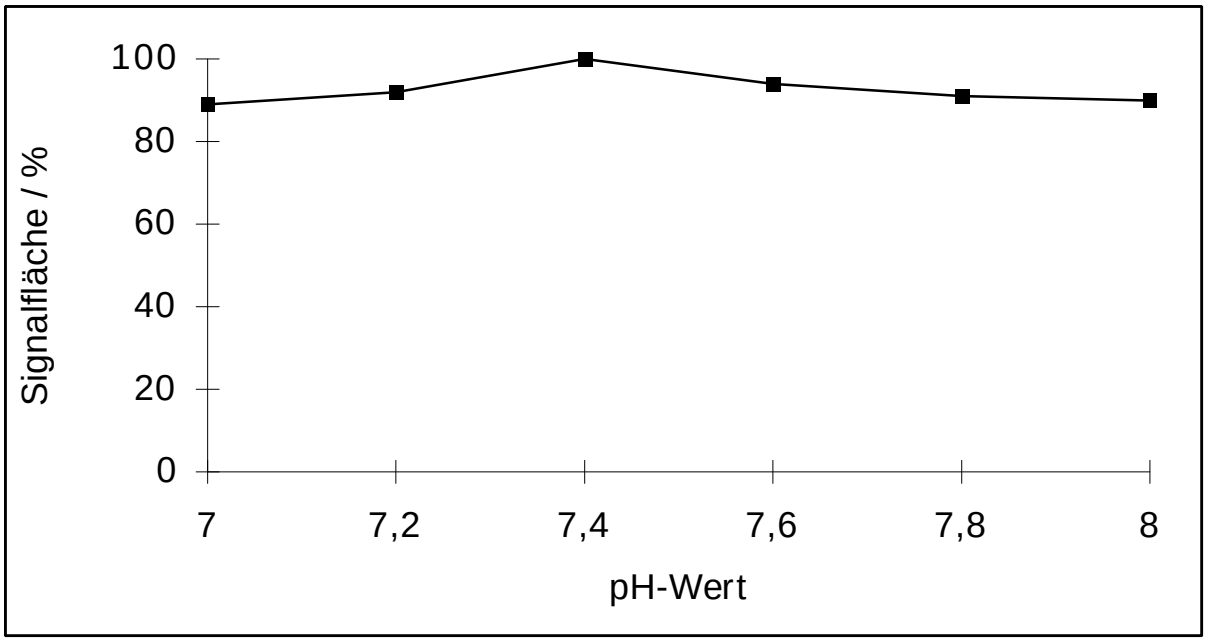

Abb. 11: Abhängigkeit der Signalfläche des Fluoreszenzsignals vom pH-Wert. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L) pH = 7,4; Lösung (B): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L) pH = 6,5-8,4; Reagenz (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L); Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; maximale Signalfläche = 100 %

Wie schon bei der chemiluminometrischen Methode ist auch bei diesen Untersuchungen ein Einfluß der Flußraten an Puffer (A) und Reagenz (B) zu erkennen. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

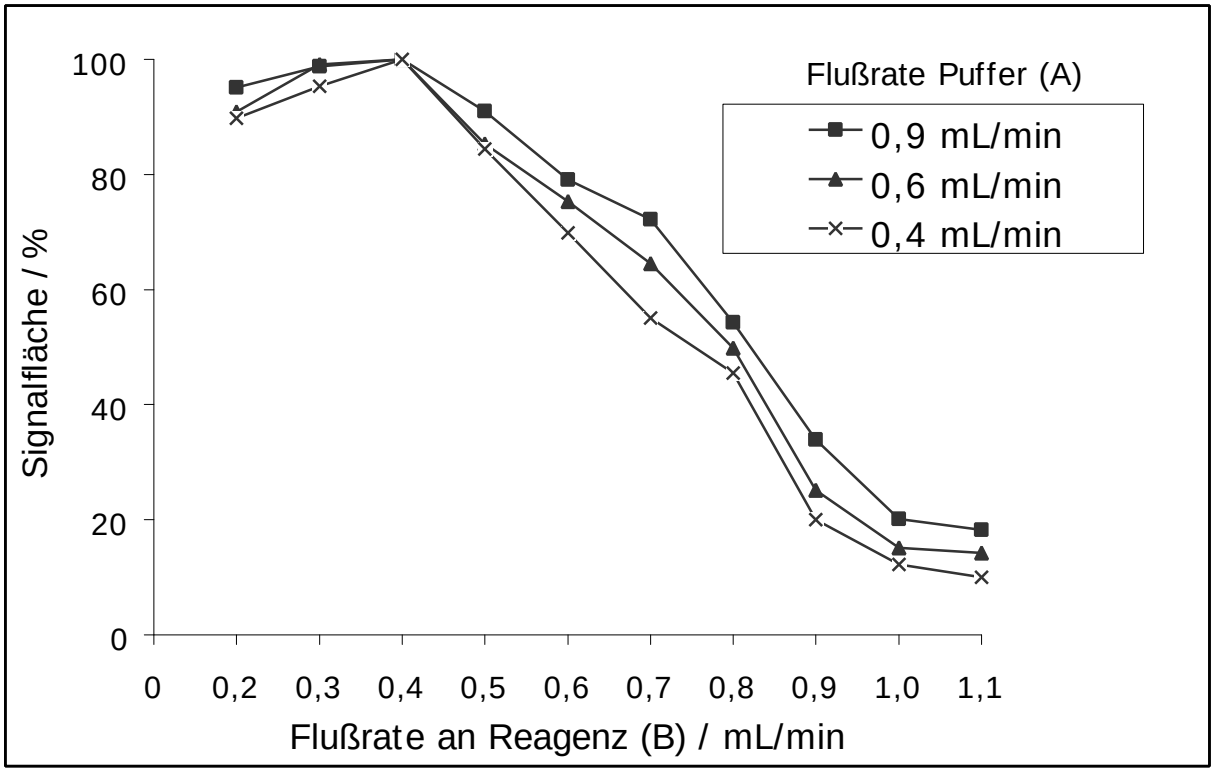

Abb. 12: Abhängigkeit der Signalfläche des Fluoreszenzsignals von den Flußraten an Puffer (A) und Reagenz (B). Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenz (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L); c(H_2O_2) = 2,3 µmol/L; $pH_{Ausgang}$ = 7,0; maximale Signalfläche = 100 %

Mit Zunahme der Flußrate an Reagenz (B) (s. Abb. 3) ist eine Abnahme des Fluoreszenzsignals verbunden. Die weiteren Arbeiten wurden mit einer Flußrate an Puffer (A) von 0,9 mL/min und an Reagenz (B) von 0,4 mL/min durchgeführt.

Unter Zusammenfassung dieser Ergebnisse läßt sich für die fluorimetrische Detektion von Wasserstoffperoxid unter den gegebenen Bedingungen (c(p-HPES) = 2 mmol/L; c(POD) = 4 U/mL; $pH_{Ausgang}$ = 7,4) eine Nachweisgrenze von 0,5 µmol/L erzielen.

Vergleicht man die zwei untersuchten Methoden zur H_2O_2-Bestimmung miteinander, so läßt sich sagen, daß beide für die enzymatische Alkoholbestimmung gut geeignet erscheinen. Die stärkere pH-Wert-Abhängigkeit der chemiluminometrischen H_2O_2-Bestimmung läßt in der Praxis allerdings höhere Signalschwankungen erwarten. Desweiteren liegt die erzielte Nachweisgrenze etwas schlechter als bei der fluorimetrischen Bestimmungsmethode. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Verfahrensentwicklung mit der fluorimetrischen Methode weitergearbeitet.

2.1.2. Enzymatische Oxidation von Methanol und Ethanol unter Bildung von H_2O_2

Wie schon weiter vorn erwähnt, vermag das Enzym Alkoholoxidase die Oxidation von Alkohol zu Aldehyd unter gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff zu H_2O_2 zu katalysieren.

Die Oxidation von Methanol und Ethanol kann

- mittels gelöster Enzyme [48,89-92] oder
- durch Enzyme erfolgen, die auf festem Trägermaterial immobilisiert wurden [53,59,93-115].

Verwendung von gelöster Alkoholoxidase

Da das Enzym Alkoholoxidase in einem ähnlichen pH-Bereich wie die Peroxidase seine größte Aktivität zeigt, erschien es sinnvoll, die Alkoholoxidase direkt der Reagenzlösung, bestehend aus p-HPES und POD, zuzugeben. Diese vereinfachte Anordnung wurde auch im Hinblick auf eine mögliche spätere Verwendung der Methode in Feldmessungen gewählt.

In Abb. 13 ist die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Konzentration der Alkoholoxidase in der Reagenzlösung dargestellt. Die Untersuchungen wurden für Methanol und Ethanol getrennt durchgeführt.

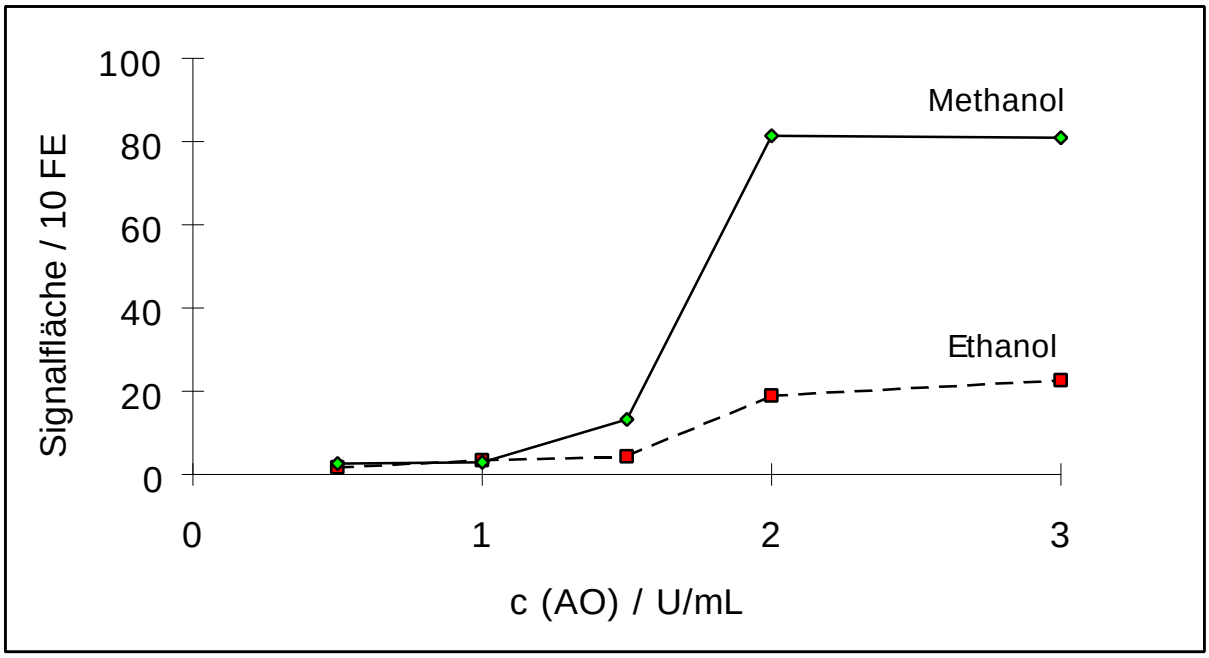

Abb. 13: Abhängigkeit der Signalfläche der Fluoreszenzintensität (FE) von der Konzentration an Alkoholoxidase. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenzlösung (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L; AO); Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; c(MeOH) = 100 µmol/L; c(EtOH) = 100 µmol/L; T = 21 °C; $pH_{Ausgang}$ = 7,4

Für beide Alkohole ist erst ab einer Konzentration an Alkoholoxidase von ca. 1,5 U/mL eine Reaktion erkennbar. Die größte Umsetzung wird für beide Alkohole ab 2 U(AO)/mL erreicht. Für die weiteren Untersuchungen wurde mit einer Mindestkonzentration an Alkoholoxidase von 2 U/mL gearbeitet.

Aus den unterschiedlichen maximal erreichten Signalen für Methanol und Ethanol ist eine ca. 4fach höhere Signalintensität für Methanol als für Ethanol erkennbar.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzsignale im Gesamtverfahren, bestehend aus der Umsetzung mit Alkoholoxidase und der Bestimmung des gebildeten H_2O_2, vom pH-Wert ist in Abbildung 14 zu sehen. Die Messung des pH-Wertes erfolgte in der Reaktionslösung am Detektorausgang.

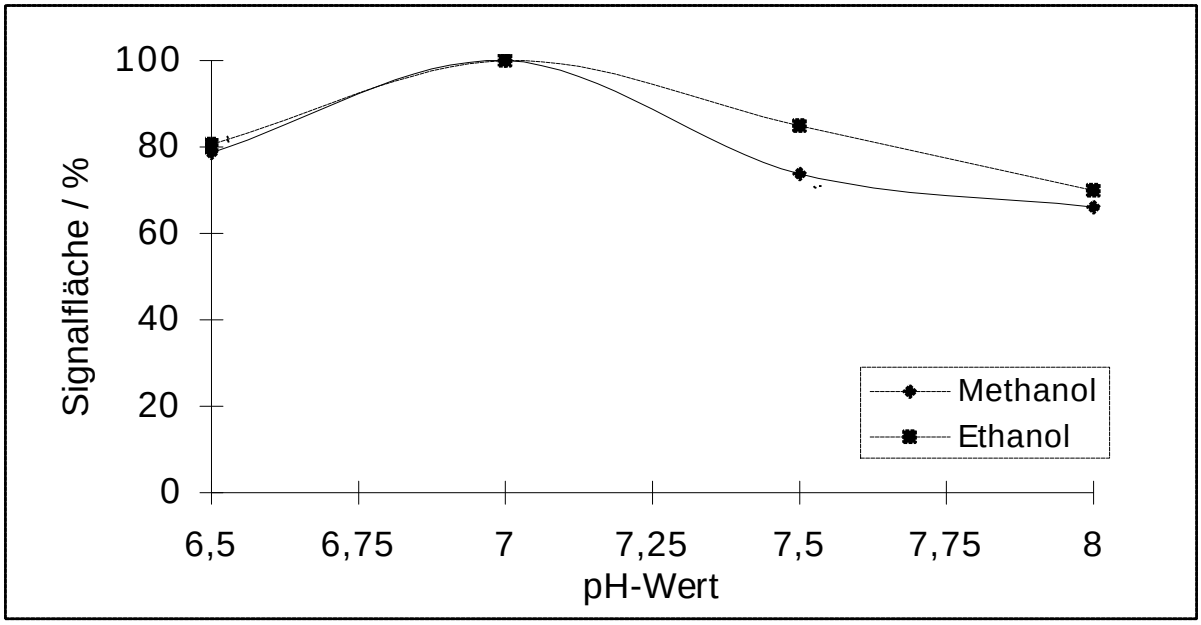

Abb. 14: Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung von Methanol und Ethanol vom pH-Wert. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); (Lösung (B): Reagenzlösung (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L; c(AO) = 2 U/mL); T = 21 °C; c(MeOH) = 100 µmol/L; c(EtOH) = 100 µmol/L; Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; maximale Signalfläche = 100 %

Es ist zu erkennen, daß das höchste Signal nach Zugabe von Alkoholoxidase für beide Alkohole bei einem um etwa 0,4 Einheiten geringeren pH-Wert auftritt als bei der reinen H_2O_2-Bestimmung (s. Abb. 11).

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Umsetzung wurde der gewebte Reaktor in einer beheizbaren Kammer der HPLC-Apparatur in einem Bereich von 22 - 40 °C temperiert. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Temperatur ist in Abbildung 15 aufgetragen.

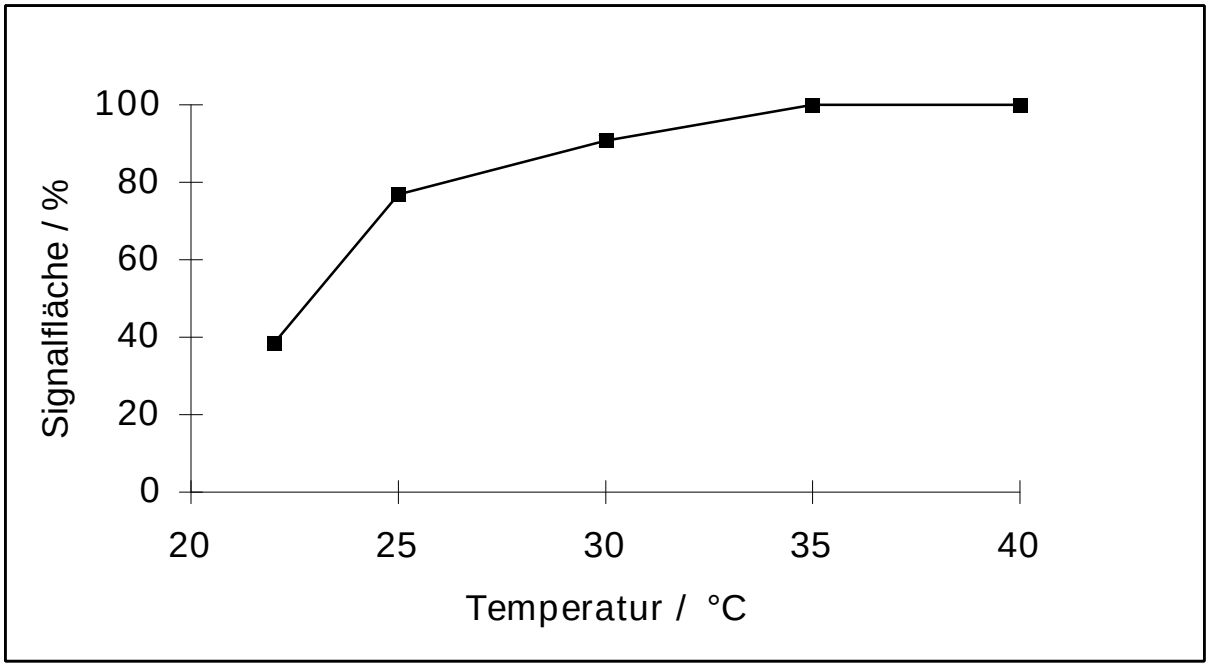

Abb. 15: Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung von der Temperatur. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenzlösung (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L; c(AO) = 2 U/mL); Q(A) = 0,9 mL/min; Q(B) = 0,4 mL/min; c(EtOH) = 100 µmol/L; maximale Signalfläche = 100 %

Es ist zu sehen, daß gerade im Bereich bis ca. 35 °C das Signal mit zunehmender Temperatur stark ansteigt. Dies bedeutet, daß zur Einhaltung geringer Signalschwankungen eine möglichst genaue Einhaltung der Temperatur notwendig ist. Für die weiteren Arbeiten wurde daher die Meßanordnung zwischen Injektionsventil und Detektor temperiert.

Immobilisierung der Alkoholoxidase auf festen Trägermaterialien

Seit den 60er Jahren wurden Methoden zur chemischen Immobilisierung entwickelt, um Enzyme in geringeren Mengen und reproduzierbarer als in Lösung in der Analytik und industriellen Biotechnologie einsetzen zu können. Von Vorteil ist hierbei nicht nur die wiederholte Nutzbarkeit des Enzyms, sondern auch die höhere thermische und chemische Beständigkeit, z.B. gegenüber pH-Wert-Änderungen, sowie die größere Reinheit der Produkte [59].

In der Literatur werden überwiegend Immobilisierungsreaktionen mit kovalentem Bindungstyp beschrieben. Dabei müssen sowohl Träger als auch Enzym bzw. Reagenz zur Verknüpfung geeignete funktionelle Gruppen aufweisen. Bei den Enzymen bzw. Reagenzien sind dies in der Regel Amino-, Carbonyl-, Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen, während bei den Trägermaterialien Hydroxyl- oder Carbonylgruppen zur Verknüpfung herangezogen werden [102]. Als Trägermaterialien erweisen sich in erster Linie Cellulose [116], Nylon [117], Kieselerde [59], Polystyrol [118] und vor allem poröses Glas [119] als geeignet.

Poröses Glas zeigt wegen einer großen Anzahl von Oberflächen-OH-Gruppen pro Gewichtsanteil eine besonders hohe Kapazität für die Bindung von Enzymen, die entweder direkt oder über ein Zwischenmolekül, einen sog. Spacer, an die Aminofunktion gekoppelt werden können. Das Spacermolekül bewirkt eine größere Beweglichkeit des angekoppelten Enzyms, so daß die Aktivität höher ist als bei einem dichter an den Träger gebundenen Enzym und günstige sterische Verhältnisse für die Enzymreaktion mit einem Substrat vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym Alkoholoxidase wie folgt immobilisiert eingesetzt:

- in Form eines kommerziell erhältlichen Enzymreaktors der Firma Biometra, Göttingen (EP 45; l = 40 mm; D = 4 mm)
- als selbst präparierter Reaktor durch Immobilisierung des Enzyms auf Glasperlen (Controlled Pore Glass; pore size: 75 Å; mesh: 200-400) [nach 120-124]

Bei dem Enzymreaktor der Firma Biometra handelt es sich um ein Kunstharzprodukt, auf dem Alkoholoxidase immobilisiert wurde. Nähere Informationen über den Enzymreaktor konnten nicht in Erfahrung gebracht werden.

Die Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von Alkoholoxidase auf porösem Glas basiert im wesentlichen auf Arbeiten von L. Campanella et al. [121], X. Xie. et al. [123] und M. Masoom und A. Townshend [124] und ist unter „Experimentelles“ (2.5.3.) näher beschrieben. Nach der Belegung mit Alkoholoxidase wurden die immobilisierten Glasperlen in eine Glassäule (l = 50 mm; D = 3 mm) gefüllt.

Zur Untersuchung wurde der jeweilige Reaktor in den Pufferstrom (A) hinter das Injektionsventil eingebaut (s. Abb. 3). Da die mit Trägermaterial befüllten Enzymreaktoren einen erhöhten Rückdruck bewirkten, wurde der Volumenstrom auf 0,3 mL/min reduziert, um den zulässigen Gegendruck der verwendeten Schlauchpumpe nicht zu überschreiten. Eine Beeinflussung des resultierenden Signals konnte dadurch nicht beobachtet werden, allerdings erhöhte sich durch die Verringerung der Gesamtflußrate die Zeit von der Injektion bis zum Auftreten des Fluoreszenzsignals.

Es wurden Alkohollösungen (c(MeOH) = c(EtOH) = 100 µmol/L) injiziert und die resultierenden Fluoreszenzsignale aufgezeichnet. Die pH-Wert-Abhängigkeit der enzymatischen Oxidation der Alkohole durch Alkoholoxidase, gemessen in der Reaktionslösung am Detektorausgang, ist in Abb. 16 für den selbst präparierten Enzymreaktor und in Abb. 17 für den gekauften Reaktor der Firma Biometra aufgezeigt.

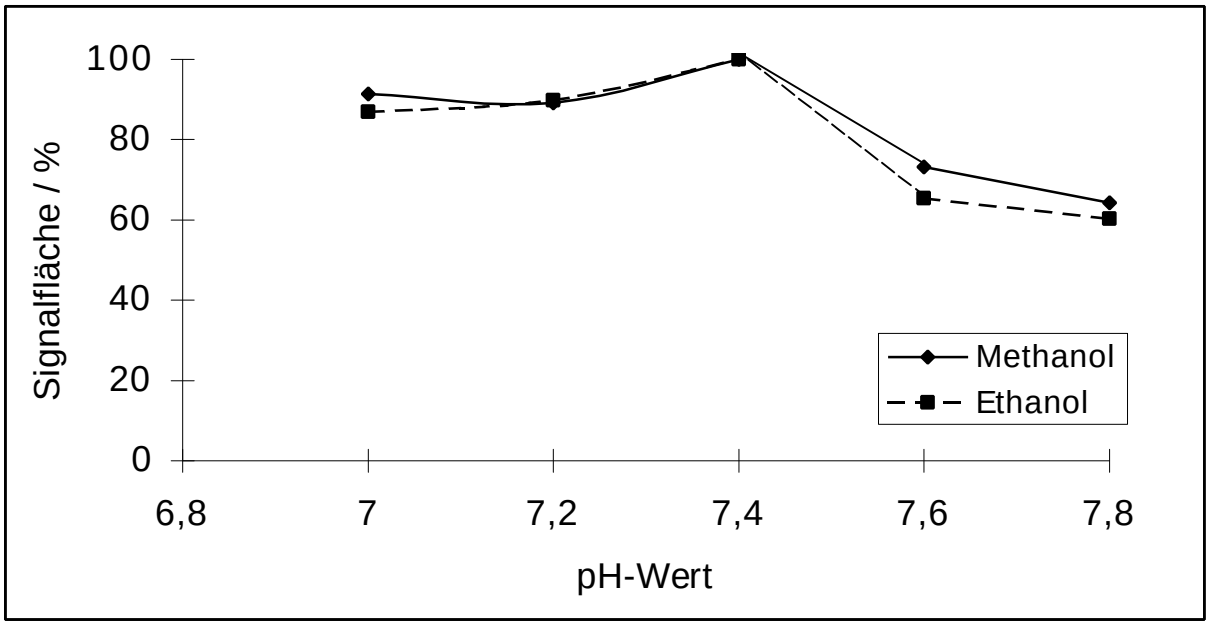

Abb. 16: Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung von Methanol und Ethanol vom pH-Wert für den selbst präparierten Enzymreaktor. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenz (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L); Q(A) = 0,3 mL/min; Q(B) = 0,3 mL/min; c(MeOH) = 100 µmol/L; c(EtOH) = 100 µmol/L; maximale Signalfläche = 100 %

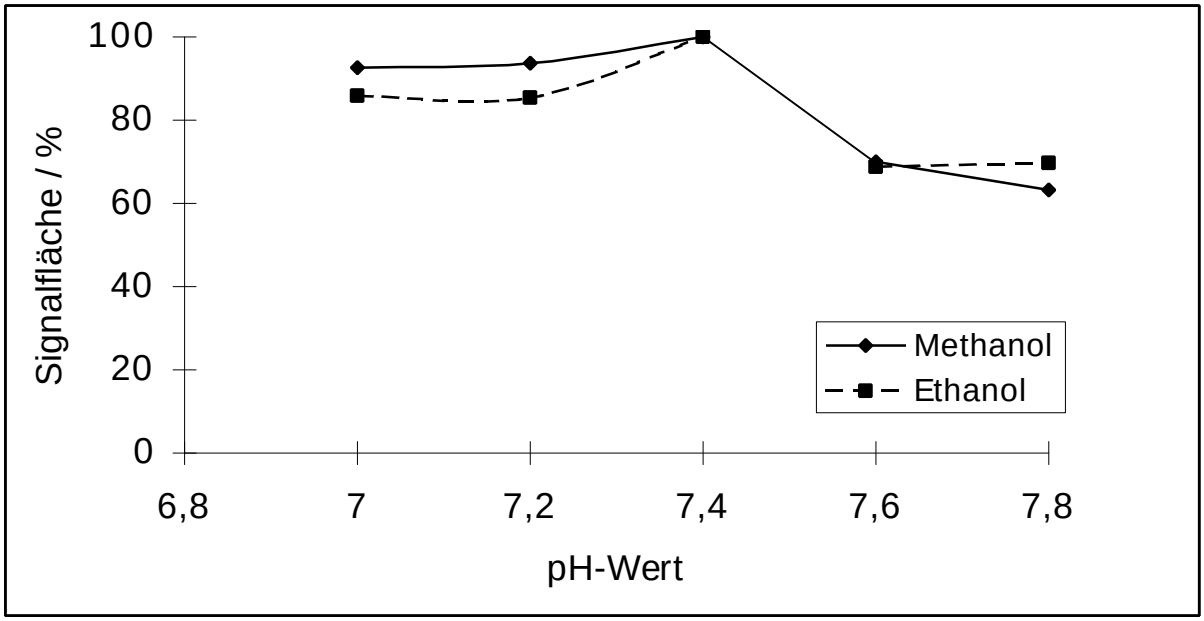

Abb. 17: Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung von Methanol und Ethanol vom pH-Wert für den Enzymreaktor von Biometra. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); Lösung (B): Reagenz (c(POD) = 4 U/mL; c(p-HPES) = 2 mmol/L); Q(A) = 0,3 mL/min; Q(B) = 0,3 mL/min; c(MeOH) = 100 µmol/L; c(EtOH) = 100 µmol/L; maximale Signalfläche = 100 %

Beide Reaktoren zeigen den gleichen Verlauf der pH-Wert-Abhängigkeit. Auffällig ist, daß für beide Reaktoren das maximale Signal bei einem etwas höheren pH-Wert (pH = 7,4) als bei Verwendung von gelöstem Enzym auftritt.

Ein Vergleich der maximalen Signale für beide Reaktoren zeigte, daß mit dem kommerziellen Reaktor der Firma Biometra eine wesentlich niedrigere Nachweisgrenze für beide Alkohole erzielt werden konnte (Tab. 5). Es ist zu erkennen, daß bei allen Methoden die Nachweisgrenze für Methanol wesentlich besser ist als die für Ethanol. Der nach Literaturangaben selbst präparierte Reaktor ist hinsichtlich Nachweisvermögen mit der Enzymlösung vergleichbar. Beide Varianten erreichen jedoch nicht annähernd die Werte des Biometra-Reaktors.

Nachweisgrenze / µmol/L

	Enzymlösung	nach Literaturangaben präparierter Enzymreaktor	Enzymreaktor der Firma Biometra
Methanol	8,5	5,0	1,0
Ethanol	40,0	100,0	4,5

Tab. 5: Vergleich der Nachweisgrenzen für die enzymatische Bestimmung der Alkohole mittels Fließinjektionsanalyse (FIA) unter verschiedenen Bedingungen

2.1.3. Flüssig-Chromatographische Trennung der Alkohole

Wie gezeigt, ist die Bestimmungsmethode für Alkohole auf Basis von Alkoholoxidase unspezifisch, d. h. sollen Methanol und Ethanol nebeneinander bestimmt werden, ist zuvor eine Trennung der Alkohole erforderlich. Bei den in der Literatur beschriebenen Trennungen mit Hilfe der Flüssigkeits-Chromatographie wurden im wesentlichen

- die Ionen-Ausschluß-Chromatographie (ICE) [125,126] und
- die Reversed-Phase-Chromatographie [127-129]

eingesetzt.

Aufgrund der Bedingungen für die enzymatische Detektion der Alkohole, wie z. B. Einhaltung eines bestimmten pH-Bereiches, war der Anwendung der RP-HPLC in dieser Arbeit der Vorzug zu geben. Außerdem waren bei der Trennung von Alkoholen unter Verwendung von RP-Säulen kürzere Retentionszeiten als bei Verwendung von ICE-Säulen zu erwarten. Im folgenden wurden nun verschiedene zur Verfügung stehende RP-Säulen hinsichtlich ihrer Eignung zur Trennung von Methanol und Ethanol untersucht. Zur Verfügung standen die Säulen:

- Hypersil ODS 3 (Korngröße = 3 µm; l = 12,5 cm; I. D. = 0,3 cm)
- Partisil ODS 3 (Korngröße = 5 µm; l = 25 cm; I. D. = 0,46 cm)
- Nucleosil 300-5C18 (Korngröße = 5 µm; l = 25 cm; I. D. = 0,4 cm)
- Nucleosil 300-5C18 (Korngröße = 5 µm; l = 12,5 cm; I. D. = 0,4 cm)

Zum Zwecke eines ersten Vergleichs wurde für die Detektion der Alkohole zunächst ein UV-Detektor (λ = 190 nm) verwendet. Es zeigte sich, daß alle vier Säulen gut für die Trennung von Methanol und Ethanol geeignet waren. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Grundlinientrennung und Auflösung wurden mit der Partisil-Säule erzielt. Diese Säule wurde anschließend mit dem Enzymreaktor der Firma Biometra und der fluorimetrischen Bestimmungsmethode gekoppelt. In Tabelle 6 sind die experimentellen Bedingungen und die erzielten Nachweisgrenzen für Methanol und Ethanol aufgeführt. Abb. 18 gibt ein für diese Bedingungen typisches Chromatogramm wieder.

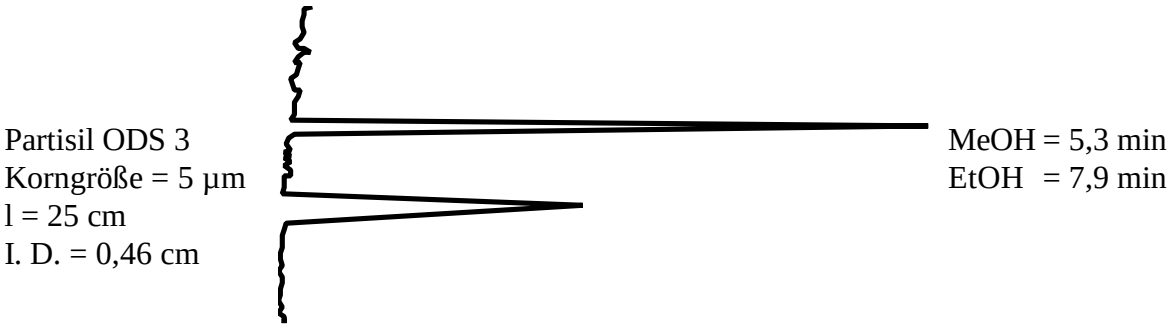

Abb. 18: Chromatogramm der Trennung von Methanol und Ethanol. Q = 0,3 mL/min; c(Phosphatpuffer) = 0,1 mol/L; c(MeOH) = 0,1 mmol/L; c(EtOH) = 0,1 mmol/L; UV-Detektor (λ = 190 nm); Injektionsvolumen = 100 µL; pH = 7,4

Trennsäule	Partisil ODS 3 Korngröße = 5 µm l = 25 cm; I. D. = 0,46 cm
Eluent	$NaHPO_4$ / KH_2PO_4 c = 0,1 mol/L; pH = 7,4
Flußrate Phosphatpuffer Flußrate Reagenz	0,3 mL/min 0,3 mL/min
Enzymreaktor	Biometra (EP45)
Detektion	Fluoreszenz (p-HPES/POD)
Nachweisgrenzen (Injektionsvolumen = 20 µL) Methanol: Ethanol:	 1,3 µmol/L 5,9 µmol/L

Tab. 6: Bedingungen für die flüssigchromatographische Bestimmung von Methanol und Ethanol mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion

2.2. Oxidation von Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase

Die enzymatische Umsetzung von Methanol und Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase erlaubt nach chromatographischer Trennung die gleichzeitige Bestimmung beider Alkohole. Unter Verwendung des käuflich erworbenen Enzymreaktors der Firma Biometra ließen sich Nachweisgrenzen erzielen, die für Methanol um den Faktor 4,5 besser waren als für Ethanol. Aufgrund der erforderlichen chromatographischen Trennung der Alkohole und der erzielten schlechteren Nachweisgrenzen für Ethanol wurde alternativ versucht, das Enzym Alkohol-dehydrogenase zur selektiven Bestimmung von Ethanol einzusetzen.

Dehydrogenasen zählen ebenso wie die Oxidasen zu den Oxidoreduktasen, die Redox-Prozesse in biologischen Systemen katalysieren. Das Enzym Alkoholdehydrogenase(ADH) ist für den Abbau von Ethanol verantwortlich [56-58,61]. Dabei fungiert Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ($NAD^{+)}$ als Coenzym und wird bei dieser Reaktion zu NADH reduziert [130,131].

$$C_2H_5\text{-}OH + NAD^+ \xleftrightarrow{ADH} CH_3\text{-}CHO + NADH + H^+ \qquad (20)$$

Das Coenzym NAD^+ transportiert Hydrid-Ionen (2 e^- und 1 H^+) und reagiert als zweites Substrat. Es ist aus Basen (Adenin, Nicotinsäureamid), einem Monosaccharid, in diesem Fall Ribose, und Phosphorsäure aufgebaut. Ribose und Adenin bzw. Nicotinsäureamid sind durch eine N-Glykosid-Bindung verknüpft, die Phosphorsäure ist mit einem Hydroxyl der Ribose verestert [56,61]. Die reduzierte Form des Coenzyms, NADH, läßt sich leicht photometrisch bzw. fluorimetrisch bestimmen.

2.2.1. NADH-Detektion durch UV-photometrische bzw. fluorimetrische Verfahren

Das bei der enzymatischen Umsetzung von Ethanol und NAD^+ entstehende NADH kann ohne weitere chemische Umsetzungen bzw. Derivatisierungen UV-photometrisch und fluorimetrisch bei folgenden Wellenlängen detektiert werden [93,132].

UV-Photometrie:	λ_{abs} = 340 nm
Fluorimetrie:	λ_{em} = 360 nm
	λ_{ex} = 460 nm

Da in dieser Reaktion ausschließlich Ethanol umgesetzt wird, ist keine vorhergehende Trennung der Alkohole erforderlich. Um die für die Ethanolbestimmung optimalen Bedingungen zu finden, wurde der Einfluß der folgenden Parameter untersucht:

- ADH-Konzentration
- NAD^+-Konzentration
- pH-Wert
- Reaktionszeit
- hohe Konzentrationen an Methanol als mögliche Störung

Die Untersuchungen wurden mittels Fließinjektionsanalyse, apparativ ähnlich der in Abb. 3 dargestellten, durchgeführt. Lösung (A) bestand aus einem 0,1 molaren Phosphatpuffer, Lösung (B) aus den Reagenzien NAD^+ und ADH. Nach Vermischung beider Volumenströme in einer gewebten Reaktions-Wendel aus Teflon® (l = 6 m; I.D. = 0,5 mm) erfolgte die fluorimetrische Detektion. Eine Immobilisierung des Enzyms Alkoholdehydrogenase erschien nicht notwendig, da das Enzym im Vergleich zu den anderen Reagenzien preiswert ist.

Die Abhängigkeit des Detektionssignals von der ADH-Konzentration ist in Abb. 19 und von der NAD^+-Konzentration in Abb. 20 dargestellt. Es ist zu sehen, daß für eine quantitative Umsetzung von Ethanol Mindestkonzentrationen von 25 U/mL ADH und 2 mmol/l NAD^+ notwendig sind.

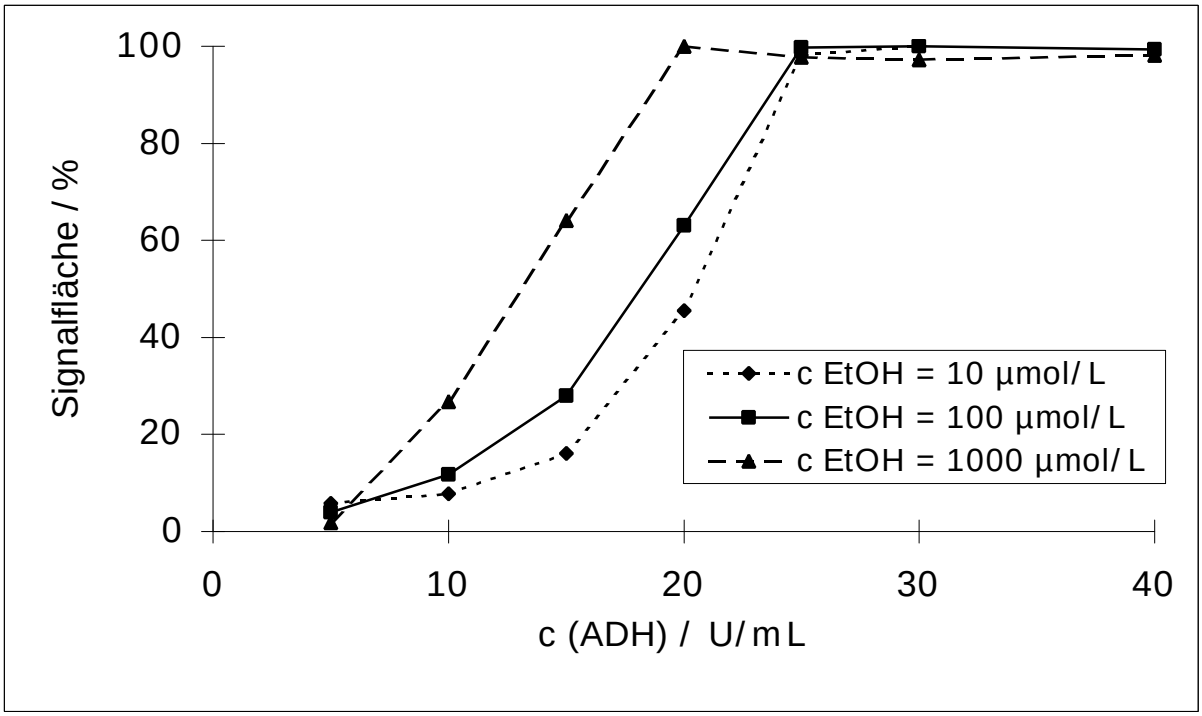

Abb. 19: Abhängigkeit der Signalfläche von der ADH-Konzentration. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 9,0); Lösung (B):Reagenz ($c(NAD^+)$ = 1,5 mmol/L; ADH); Injektionsvolumen = 100 µL; Q(A)= Q(B) = 0,3 mL/min; maximale Signalfläche = 100 %

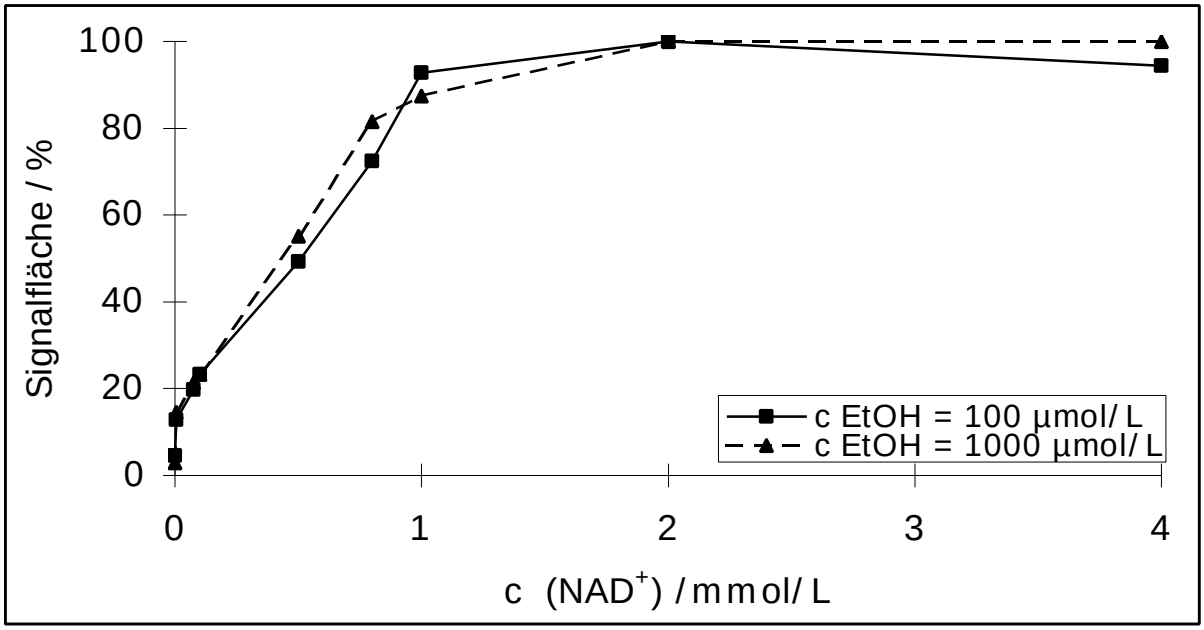

Abb. 20: Abhängigkeit der Signalfläche von der NAD^+-Konzentration. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 9,0); Lösung (B): Reagenz (NAD^+; c(ADH) = 25 U/mL); Injektionsvolumen = 100 µL; Q(A)= Q(B) = 0,3 mL/min; maximale Signalfläche = 100 %

Die Abhängigkeit des Detektorsignals vom pH-Wert, gemessen in der Reaktionslösung am Detektorausgang, ist in Abb. 21 aufgetragen. Es ist zu sehen, daß eine meßbare Umsetzung praktisch erst ab pH = 8 erfolgt. Das Maximum liegt bei ca. pH = 10,5. Bei höheren pH-Werten fällt das Signal stark ab, da in diesem Bereich wahrscheinlich eine Desaktivierung des Enzyms eintritt. Für die weiteren Untersuchungen wurde ein pH-Wert von pH = 9,0 eingestellt, da bei diesem Wert eine bessere Stabilität der enzymatischen Lösung als bei pH = 10,5 gegeben ist, auch wenn damit eine Signalreduzierung in Kauf genommen werden muß.

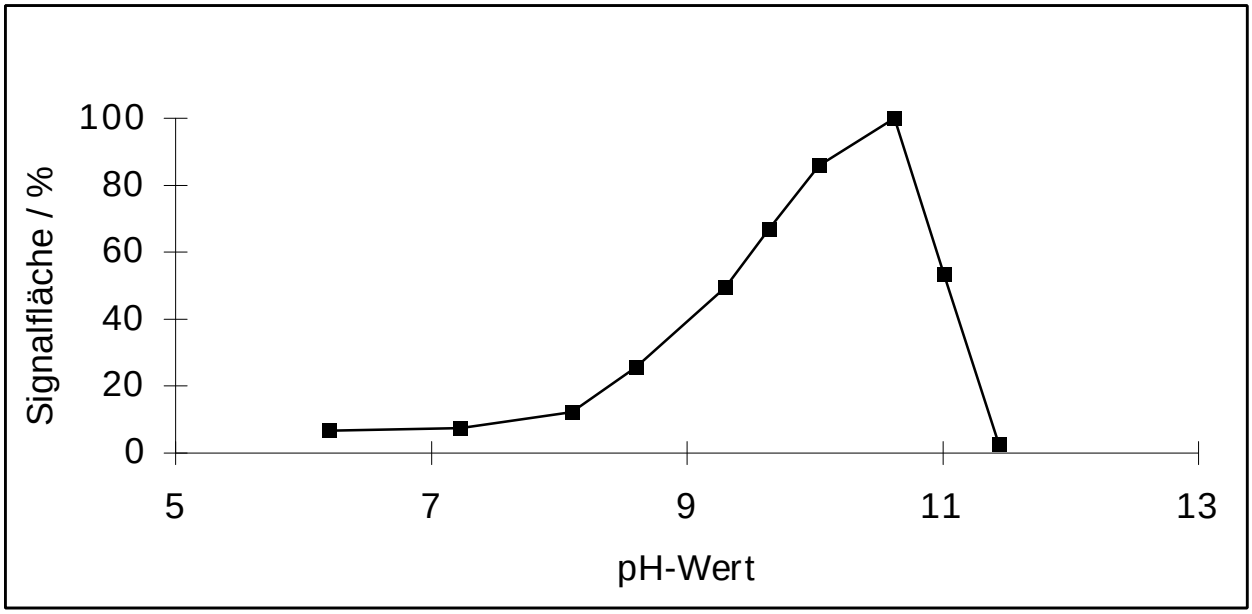

Abb. 21: Abhängigkeit der Umsetzung zu NADH vom pH-Wert. Lösung (A): a) pH = 6,1-9,0 (Phosphatpuffer); b) pH = 9,0-11,2 (Glycin; NaCl; NaOH); Lösung(B): Reagenz (c(ADH) = 25 U/mL; c(NAD^+) = 2 mmol/L); Injektionsvolumen = 100 µL; Q(A)= Q(B) = 0,3 mL/min; c(EtOH) = 100 µmol/L; maximale Signalfläche = 100 %

Unter den gegebenen Bedingungen (Reaktor: l = 6m; I.D. = 0,5 mm; V = 1,18 mL; $Q_{ges.}$ = 0,6 mL/min) ergibt sich für die Reaktanden nach Injektion eine Reaktionszeit vor Eintritt in den Detektor von ca. 2 min. In einer weiteren Untersuchung sollte geklärt werden, ob diese Zeit für eine quantitative Umsetzung von Ethanol ausreichend ist. Dazu wurden in Eppendorf®-Gefäßen Ethanolproben (c(EtOH) = 1 mmol/L; V = 100 µL) mit Reaktionslösung (c(ADH) = 20 mmol/L(V = 100 µL); c(NAD^+) = 250 U/mL(V = 100 µL); c(Phosphatpuffer) = 0,1 mol/L(V = 700 µL; pH = 9,0)) vermischt und die Fluoreszenz-Signale nach verschiedenen Zeiten gemessen.

Die Proben hatten folgende Endkonzentrationen:

c(EtOH) = 0,1 mmol/L
c(NAD^+) = 2 mmol/L
c(ADH) = 25 U/mL

Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 22 dargestellt. Es ist zu sehen, daß der maximale Umsatz bereits nach 2 Minuten erreicht ist. Die Dimensionen des verwendeten Teflon-Reaktors sind also bei den gewählten Flußraten für eine quantitative Umsetzung von Ethanol mit ADH und NAD^+ ausreichend.

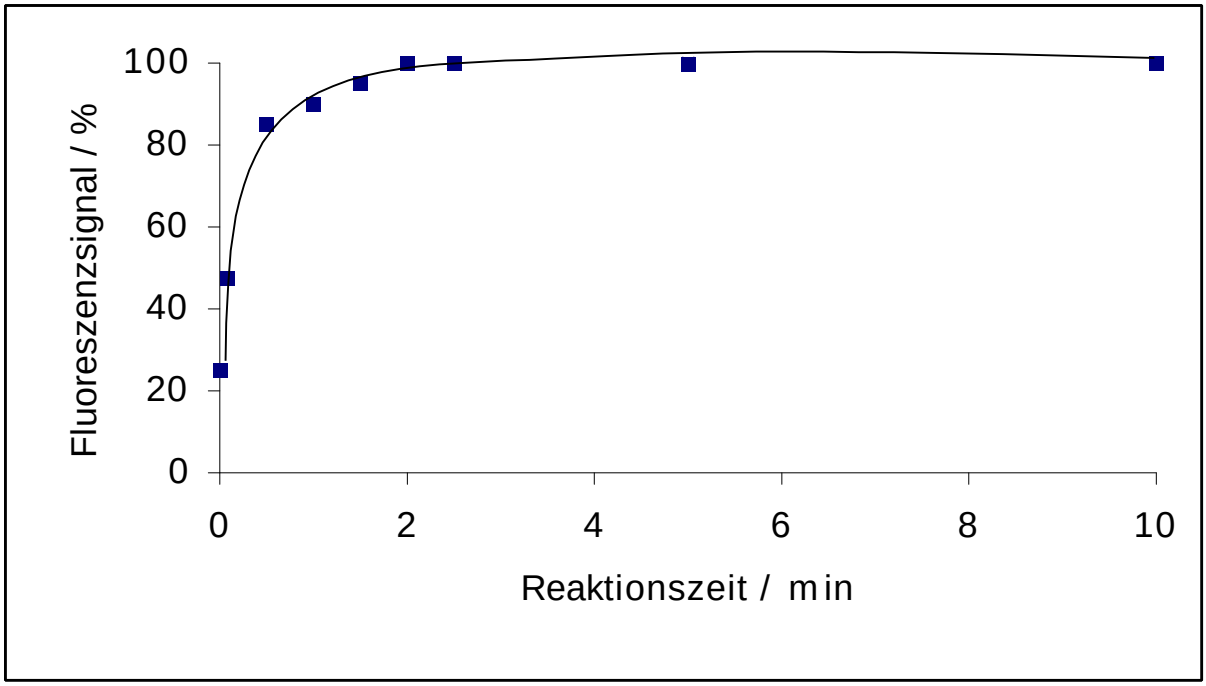

Abb. 22: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Reaktionszeit. maximales Signal = 100 %

Um einen eventuellen Einfluß von hohen Konzentrationen an Methanol auf die Ethanolbestimmung zu untersuchen, wurden unterschiedliche Methanollösungen (c = 1 µmol/L bis 1 mmol/L) zu den Ethanolproben hinzugemischt. Bis zu einer Methanolkonzentration von 1 mmol/L konnten weder ein signifikanter Blindwert noch eine Beeinflussung des NADH-Signals beobachtet werden. Somit können auch hohe Konzentrationen an Methanol als Störung für die Ethanolbestimmung ausgeschlossen werden.

2.2.2. Steigerung des Nachweisvermögens durch Zugabe von Aldehyddehydrogenase (AlDH)

In früheren Studien [131,133,134] wird vorgeschlagen, das Nachweisvermögen der Ethanolbestimmung mit Hilfe des Enzyms Aldehyddehydrogenase zu steigern. Dabei wird das bei der Reaktion gebildete Acetaldehyd zu Essigsäure oxidiert. Hierdurch wird möglicherweise das Gleichgewicht der Umsetzung von Ethanol verschoben und durch die Aldehydoxidation zusätzlich NADH gebildet.

$$C_2H_5\text{-}OH + NAD^+ \xleftrightarrow{ADH} CH_3\text{-}CHO + NADH + H^+ \qquad (20)$$

$$CH_3\text{-}CHO + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{AlDH} CH_3\text{-}COOH + NADH + H^+ \qquad (21)$$

$$C_2H_5OH + 2\,NAD^+ + H_2O \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + 2\,NADH + 2\,H^+ \qquad (22)$$

Pro Mol Ethanol würden somit 2 Mol NADH gebildet. Voraussetzung für den Gebrauch des Enzyms Aldehyddehydrogenase ist, daß in der zu bestimmenden Probe kein Acetaldehyd vorhanden ist, andernfalls wäre das resultierende Signal als Summe aus Ethanol und Acetaldehyd anzusehen.

Für diese Untersuchungen wurden nun unterschiedliche Konzentrationen an Aldehyddehydrogenase zur Reaktionslösung zugesetzt. Der Konzentrationsbereich variierte von 0 bis 3 U(AlDH)/mL. Die Messungen erfolgten mit 10 und 100 µmolaren Ethanollösungen.

In Abb. 23 ist die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Aldehyddehydrogenase-konzentration dargestellt.

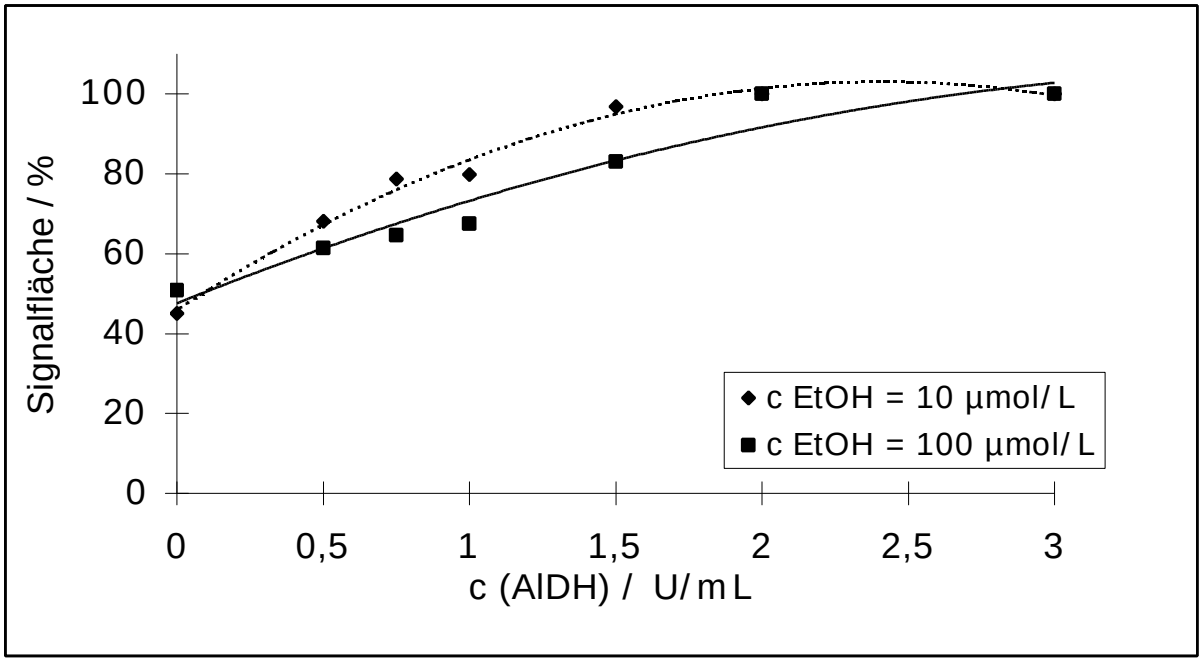

Abb. 23: Abhängigkeit der Signalfläche von der Aldehyddehydrogenasekonzentration. Lösung (A): Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 9,0); Lösung (B): Reagenz ($c(NAD^+)$ = 2 mmol/L; c(ADH) = 25 U/mL; AlDH); Q(A) = Q(B) = 0,3mL/min; maximale Signalfläche = 100 %

Wie hieraus zu erkennen ist, nimmt das Fluoreszenzsignal mit steigender Konzentration an AlDH zu. Die Signalintensität läßt sich durch Zusatz von Aldehyddehydrogenase, das einer Konzentration von 2 U(AlDH)/mL entspricht, etwa verdoppeln. Dies deutet darauf hin, daß durch diese Maßnahme das gebildete Acetaldehyd weiterreagiert, ohne daß dadurch eine Gleichgewichtsverschiebung der Umsetzung von Ethanol stattfindet.

Unter Zusammenfassung der bisher erzielten Ergebnisse können unter den aufgeführten Bedingungen

- $c(NAD^+)$ = 2 mmol/L
- c(ADH) = 25 U/mL
- pH = 9,0

folgende Nachweisgrenzen für die Ethanolbestimmung erzielt werden:

- unter Verwendung eines UV-Detektors (λ_{abs} = 340 nm):

ohne AlDH-Zugabe: 0,73 µmol/L
c(AlDH) = 2 U/mL: 0,47 µmol/L

- unter Verwendung eines Fluoreszenz-Detektors (λ_{em} = 360 nm; λ_{ex} = 460 nm)

ohne AlDH-Zugabe: 0,66 µmol/L
c(AlDH) = 2 U/mL: 0,43 µmol/L

2.3. Kombinierte Anwendung der Enzyme Alkoholoxidase und Alkohol-dehydrogenase

Die unter Abschnitt 2.2. dargestellte enzymatische Umsetzung von Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase und des Coenzyms NAD^+ erlaubt die selektive und empfindliche Bestimmung von Ethanol. Eine gleichzeitige Bestimmung von Methanol und Ethanol ist nur durch die unter Abschnitt 2.1. beschriebene Anwendung des Enzyms Alkoholoxidase möglich. Dieses Verfahren weist jedoch eine wesentlich schlechtere Nachweisgrenze für Ethanol auf als das für die Bestimmung mit Hilfe von Alkoholdehydrogenase. Desweiteren ist zur Unterscheidung von Methanol und Ethanol eine zeitaufwendige chromatographische Trennung notwendig. Um sowohl eine möglichst niedrige Nachweisgrenze für Ethanol zu erreichen als auch die Alkohole ohne chromatographische Trennung nebeneinander bestimmen zu können, wurde nun versucht, beide enzymatische Umsetzungen kombiniert anzuwenden.

Hierzu wurde folgende Annahme gemacht:

Die Differenz der Gesamtalkoholkonzentration, bestimmt mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase, und der Konzentration an Ethanol, bestimmt mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase, ist der Methanolkonzentration äquivalent.

$$X_{AO} = c\,(EtOH) \cdot a_{AO} + c\,(MeOH) \cdot b_{AO} \qquad (23)$$

X_{AO} = Summensignal der Alkoholbestimmung mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase

a_{AO} = Steigung der Kalibrierfunktion für Ethanol in Bezug auf das Alkoholoxidasesystem

b_{AO} = Steigung der Kalibrierfunktion für Methanol in Bezug auf das Alkoholoxidasesystem

$$c\,(MeOH) = (X_{AO} - c\,(EtOH) \cdot a_{AO}) / b_{AO} \qquad (24)$$

c (EtOH) = Ethanolkonzentration bestimmt durch ADH

Diese Berechnung setzt voraus, daß die Faktoren a und b von der jeweils anderen Alkoholkonzentration unabhängig sind und die Achsenabschnitte bei c(EtOH) = 0 µmol/L bzw. c(MeOH) = 0 µmol/L näherungsweise null ergeben. Um dies zu überprüfen, wurden Kalibrierreihen für Ethanol- bzw. Methanol-Lösungen im Konzentrationsbereich 0-20 µmol/L aufgenommen, denen jeweils der andere Alkohol (0-20 µmol/L) zugesetzt worden war. Die Untersuchungen erfolgten im Batch-Verfahren mit anschließender fluorimetrischer Bestimmung.

Dazu wurden in Eppendorf-Gefäßen folgende Lösungen gemischt

1 mL Probenlösung (c(Alkohol) = 0 - 20 µmol/L)

+ 50 µL Phosphatpuffer (pH = 7,4; c = 0,1 mol/L)

+ 10 µL Alkoholoxidase (c = 55 U/mL)

+ 10 µL Peroxidase (c = 110 U/mL)

+ 30 µL p-Hydroxyphenylessigsäure (c = 18 mmol/L)

und nach 10 min Reaktionszeit fluorimetrisch vermessen (λ_{ex} = 286 nm; λ_{em} = 400 nm).

In Abb. 24 sind die Kalibrierkurven für Methanol, in Abb. 25 die für Ethanol dargestellt.

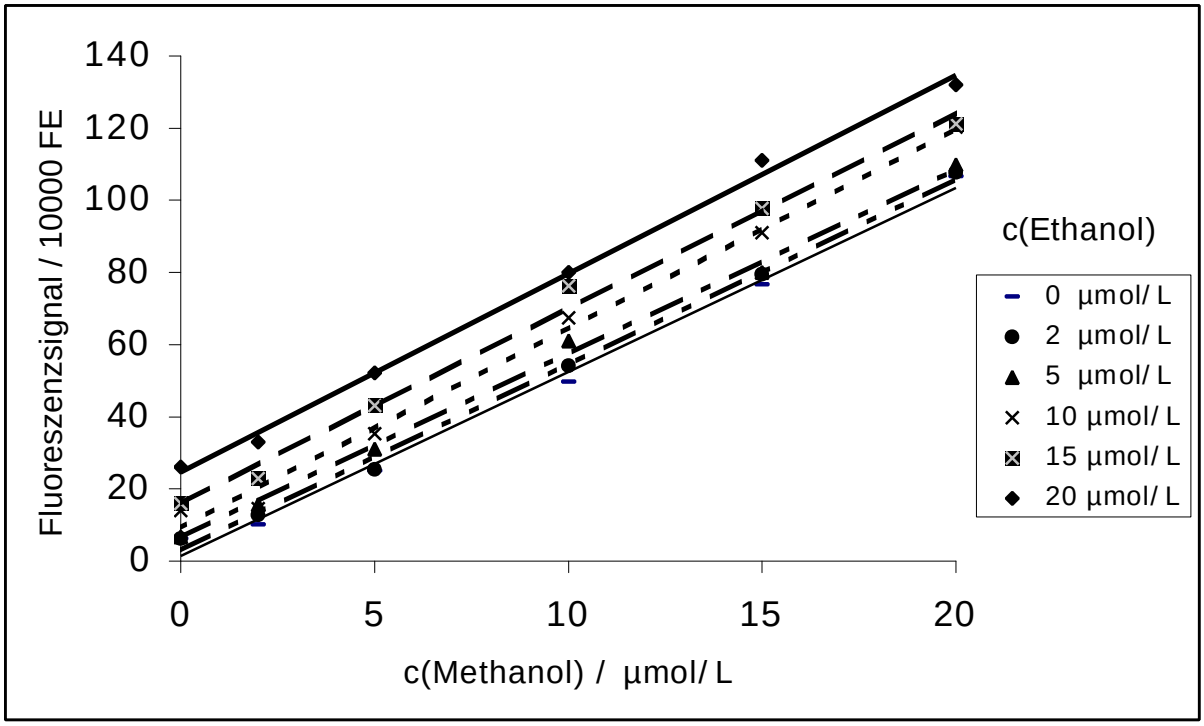

Abb. 24: Kalibrierreihen für Methanol bei Vorliegen bestimmter Ethanolkonzentrationen

c(EtOH) /µmol/L	Steigung/ FE ·L/µmol	Achsenabschnitt	r^2
0	51088	13928	0,994
2	51428	30989	0,996
5	50217	78270	0,996
10	54924	98606	0,994
15	52244	188635	0,994
20	55027	251091	0,994

52488 ± 2034 (4 %)

Tab. 7 Ergebnisse der linearen Regression für die Methanol-Kalibrierkurven in Gegenwart verschiedener Ethanolkonzentrationen unter Verwendung von Alkoholoxidase

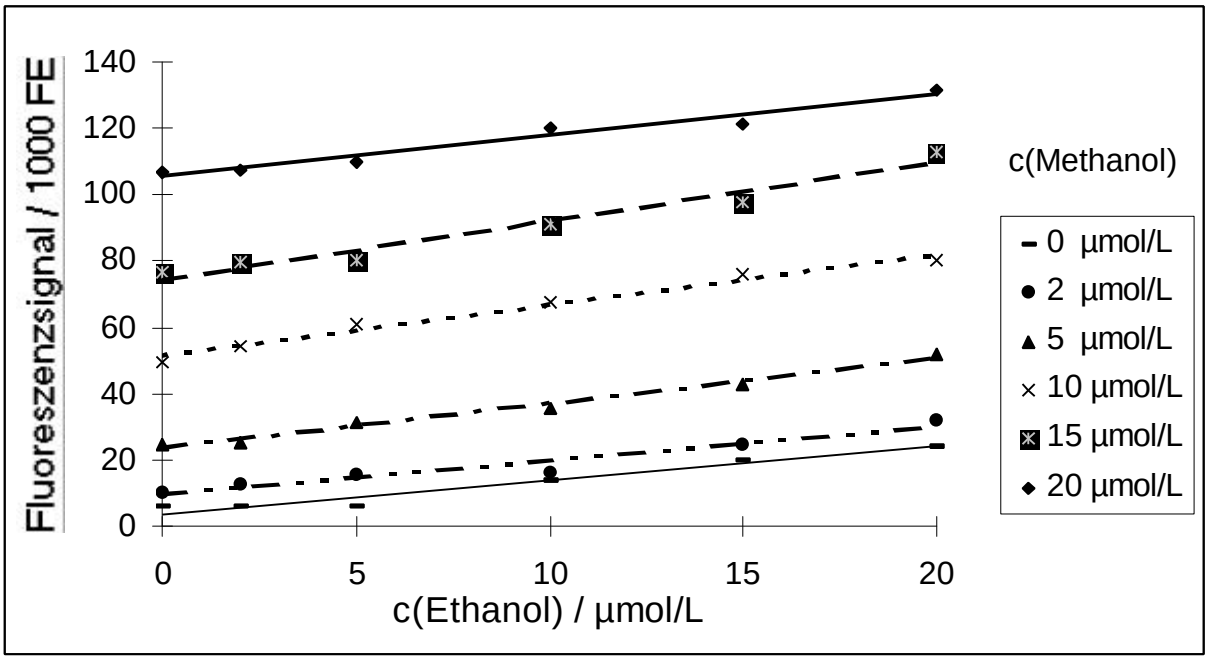

Abb. 25: Kalibrierreihen für Ethanol bei Vorliegen bestimmter Methanolkonzentrationen

c(MeOH) / µmol/L	Steigung / FE · L/µmol	Achsenabschnitt	r^2
0	10315	51328	0,992
2	11269	93461	0,937
5	13556	235979	0,982
10	15172	515429	0,976
15	17594	744057	0,958
20	12404	1054622	0,958

13385 ± 2675 (20 %)

Tab. 8 Ergebnisse der linearen Regression für die Ethanol-Kalibrierkurven in Gegenwart verschiedener Methanolkonzentrationen unter Verwendung von Alkoholoxidase

Wie aus den Abbildungen 24 und 25 zu entnehmen ist, zeigen die Kalibrationsreihen zwar das erwartete lineare Verhalten, jedoch sind die Kurven mit zunehmender Konzentration des jeweils anderen Alkohols aus dem Koordinatenursprung verschoben. Die daraus resultierenden Steigungen (s. Tab. 7 und 8) entsprechen den Faktoren a und b in Gleichung 23 und 24. Sie weisen aber insbesondere für die Ethanolkalibrierungen relativ hohe Schwankungen auf (s.Tab.8), so daß die daraus zu berechnenden Methanolkonzentrationen mit sehr großen Unsicherheiten behaftet wären.

2.4. Vergleich der Bestimmungsmethoden für Methanol und Ethanol in wässriger Lösung

Unter Berücksichtigung der zuvor dargestellten Ergebnisse erscheinen folgende Methoden geeignet zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in wässrigen Proben:

1) Chromatographische Trennung von Methanol und Ethanol, enzymatische Umsetzung mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase und anschließende Bestimmung des gebildeten H_2O_2

Die enzymatische Umsetzung von Alkoholen mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase erlaubt die Bestimmung von Methanol und Ethanol nach chromatographischer Trennung. Aufgrund dieses Erfordernisses ist jedoch für jede Analyse eine Zeit von ca. 10 min notwendig. Wegen der geringen H_2O_2-Ausbeute bei der Umsetzung von Ethanol läßt sich für diesen Alkohol nur eine relativ hohe Nachweisgrenze erzielen. Dagegen scheint das Verfahren für eine ausreichend nachweisstarke Methanolbestimmung geeignet zu sein [135,136].

Es lassen sich mit dem genannten Verfahren folgende Nachweisgrenzen erzielen:

für Methanol: 1,3 µmol/L
für Ethanol: 5,9 µmol/L

2) Selektive Bestimmung von Ethanol mit Hilfe des EnzymsAlkoholdehydrogenase

Diese Methode erlaubt eine nachweisstarke Bestimmung von Ethanol. Aufgrund der Selektivität des Enzyms ADH ist in diesem Falle keine chromatographische Trennung erforderlich, so daß die Alkoholbestimmung in einer einfachen Fließinjektionsanalyse durchgeführt werden kann. Die Detektion kann UV-photometrisch oder fluorimetrisch erfolgen. Durch Zugabe von Aldehyddehydrogenase zur Reaktionslösung läßt sich der Umsatz zum Reaktionsprodukt NADH um den Faktor zwei steigern, wobei allerdings die Anwesenheit von Acetaldehyd in der Probenlösung ausgeschlossen sein muß.

Ohne Verwendung von Aldehyddehydrogenase lassen sich folgende Nachweisgrenzen erzielen:

- unter Verwendung eines UV-Detektors (λ_{abs} = 340 nm):
  0,73 µmol/L
- unter Verwendung eines Fluoreszenz-Detektors (λ_{em} = 360 nm; λ_{ex} = 460 nm)
  0,66 µmol/L

2.5. Experimentelles

2.5.1. Geräte und Materialien

- HPLC	Sykam S-411, Gilching
- Trennsäulen	Partisil ODS 3-5 ([250 + 40] · 4,6 mm) (Fa. Knauer; Berlin) Hypersil ODS 3-3 ([125 + 40] · 3 mm) (Fa. Knauer, Berlin) Nucleosil 300-5 C 18 ([250 + 40] · 4 mm) (Fa. CS, Langerwehe) Nucleosil 300-5 C 18 ([125 + 40] · 4 mm) (Fa. CS, Langerwehe)
- Phosphatpuffer	Natriumdihydrogenphosphat (0,1 mol/L) (1 Teil) di-Kaliumhydrogenphosphat (0,1 mol/L) (4 Teile) pH = 7,5
- Glycin-Puffer	Glycin (0,1 mol/L) NaCl (0,1 mol/L) NaOH (0,1 mol/L) pH = 8,6-12,8
- UV-Detektor	Spektra 200 Variable wavelength detector (Fa. Reno, Nevada)
- Fluoreszenz-Detektor	S 3400 (Fa. Sykam, Gilching)
- Integrator	C-R6A Chromatopac (Fa. Sykam, Gilching)
- Schreiber	SE 120 (Fa. BBC Goerz Metrawatt, Köln)
- Photomultiplier (Reaktion von H_2O_2 mit Luminol)	R 928 mit Spannungsteiler E 717-21 und magn. Abschirmung E 989 (Fa. Hamamatsu, Herrsching) in Eigenbaugehäuse

2.5.2. Chemikalien

- Wasserstoffperoxid 30 %	Merck 822287
- Methanol 99,8 %, Lichrosolv®	Merck 106018
- Ethanol 99,8 %, Lichrosolv®	Merck 111727
- Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat z.A.	Merck 106346
- di-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei z.A.	Merck 105104
- Alkohol-Dehydrogenase, EC 1.1.1.1., Lyophilisat aus Hefe	Boehringer Mannheim GmbH 102717
- Nicotinamid-Adenindinucleotid, ca. 100 % free acid, grad I	Boehringer Mannheim GmbH 127973
- Aldehyddehydrogenase, EC 1.2.1.5., 250 U Lyophilisat aus Hefe	Boehringer Mannheim GmbH 171832
- Alkoholoxidase, EC, 1000 U, aus Pichia Pastoris	Sigma A-2404
- Peroxidase, EC: 1.11.1.7., aus Merrettich, Hydrogen-Peroxid-Oxidoreduktase, 727 U / mg	Fluka 77333
- p-Hydroxyphenylessigsäure 98 %	Fluka 56140
- 3-Aminopropyltriethoxysilan 96 %	Fluka 09324
- Glycin p. A.	Merck 816013
- Natriumchlorid p. A.	Merck 106400
- Natriumhydroxid p.A.	Fluka 71692
- Glutardialdehyd 25 %ige wäßrige Lösung	Merck 4239
- Controlled-Pore-Glas; Pore Size: 75 Å; Mesh: 200 - 400	Sigma G-9639
- Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$)	Merck 102790
- 5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazindion-(1,4) zur Synthese	Merck 7136466

2.5.3. Immobilisierung der Glasperlen mit Alkoholoxidase

1,0 g Glasperlen wurden mit 100 mL 5 %iger Salpetersäure für 30 min in einem 250 mL-Rundkolben gerührt, durch einen Filtertiegel Nr. 3 filtriert, mit dest. Wasser gewaschen und 5 h bei 95 °C getrocknet. Für die Silanisierung wurde eine Mischung aus 5 mL 3-Aminopropyltriethoxysilan und 45 mL dest. Wasser mit 5 molarer HCl auf pH = 3,45 eingestellt. Die trockenen Glasperlen wurden zusammen mit dem Silylierungsreagenz unter Schutzgas (N_2) in einem 250 mL-Zweihalskolben auf dem Wasserbad unter Rückfluß bei 80 °C für 150 min zur Reaktion gebracht. Die silylierten Glasperlen wurden danach durch einen Filtertiegel Nr. 3 filtriert, mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 95 °C getrocknet.

Eine Menge von 0,4 g der aktivierten Glasperlen wurde mit 4 ml eines Gemisches aus 2 mL abs. EtOH und 2 mL 25 %igem Glutardialdehyd für 2 h bei RT unter N_2 gerührt. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte, indem 200 µL (343 U) Alkoholoxidase in 8 mL 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,5) zu den aktivierten Glasperlen gegeben und der Ansatz 36 h im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt wurde. Die Glasperlen mit dem immobilisierten Enzym wurden abfiltriert, zuerst mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,5) und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich in eine Glassäule (l = 50 mm; D = 3 mm), die durch eine Fritte verschlossen wurde, gefüllt. Nach Gebrauch wurde der Enzymreaktor im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

3. Untersuchungen zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft

Die bisher vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß beide Alkohole, Methanol und Ethanol, in wässrigen Medien empfindlich bestimmt werden können. Im folgenden soll untersucht werden, ob dies auch für ein gasförmiges Medium wie Luft gilt. Hierzu müssen zunächst Testgase im zu untersuchenden Konzentrationsbereich reproduzierbar und zuverlässig zur Verfügung gestellt werden.

3.1. Methoden zur Herstellung von Testgasgemischen

Man unterscheidet bei der Herstellung von Testgasen statische und dynamische Methoden. Statische Methoden basieren z.B. auf einer Mischung bekannter Volumina von Gasen. Eine oder mehrere Substanzen (gasförmig oder flüssig) werden hierbei einem bekannten Volumen des Trägergases zugefügt [137-141]. Hierbei sind Partialdruckverfahren, gravimetrische und volumetrische Verfahren zu nennen. Statische Verfahren sind besonders zur Herstellung kleiner Volumina von Testgasmischungen in Stahlzylindern, Glasgefäßen oder Kunststoffbehältern geeignet. Der Vorteil dieser Methoden ist der relativ geringe apparative Aufwand. Nachteile sind in bestimmten Fällen in Adsorptionseffekten an den Wänden zu sehen und in den Ungenauigkeiten, die bei sehr hohen Verdünnungen auftreten [137-141]. Dynamische Methoden basieren auf einem kontinuierlichen Eintrag der Komponenten in ein strömendes Trägergas. Grundlage der Verfahren sind Permeation, Diffusion, Verdampfung, Mischen von Gasströmen, Elektrolyse und chemische Reaktion [142-146]. Voraussetzung ist ein Konzentrationsgradient zwischen einem Reservoir der Substanz, die in fester, flüssiger oder gelöster Form vorliegt, und einem kontinuierlich strömenden Trägergas. Dynamische Verfahren eignen sich besonders zur Herstellung von Prüfgasen mit reaktiven oder instabilen Komponenten. Die resultierende Testgaskonzentration hängt vom Volumenstrom des Trägergases und vom Massentransport aus dem Reservoir ab, der durch eine Düse, Kapillare oder eine poröse/nicht-poröse Membran begrenzt und kontrolliert werden kann.

In der Literatur ist eine große Anzahl von Methoden zur dynamischen Testgaserzeugung beschrieben, die in der Regel auf Permeations- und Diffusionsprozessen beruhen [142-146]. Wenn bei diesen Testgasgeneratoren mit einer reinen Komponente im Reservoir gearbeitet wird, läßt sich der Massentransport pro Zeit einfach durch Wägen der Testgasquelle in bestimmten Zeitintervallen bestimmen. Bei Anwendung dieser Absolutmethode ist dann die Permeationsquelle ein primärer Standard, wie er z.B. für den Gebrauch der Gase NH_3, SO_2 und NO_2 eingesetzt wurde [144,145]. Bei Substanzen wie z.B. HF oder HCl ist aus Sicherheitsgründen die Verwendung von Lösungen im Reservoir zu empfehlen. Hierzu muß die Massentransportrate der gelösten Komponenten durch ein äußeres Analysenverfahren bestimmt werden.

3.2. Aufbau von Testgasquellen zur Erzeugung gasförmiger Alkohole im ppb_V-ppm_V-Bereich

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in Abb. 26 skizzierte dynamisch arbeitende Testgasquelle eingesetzt.

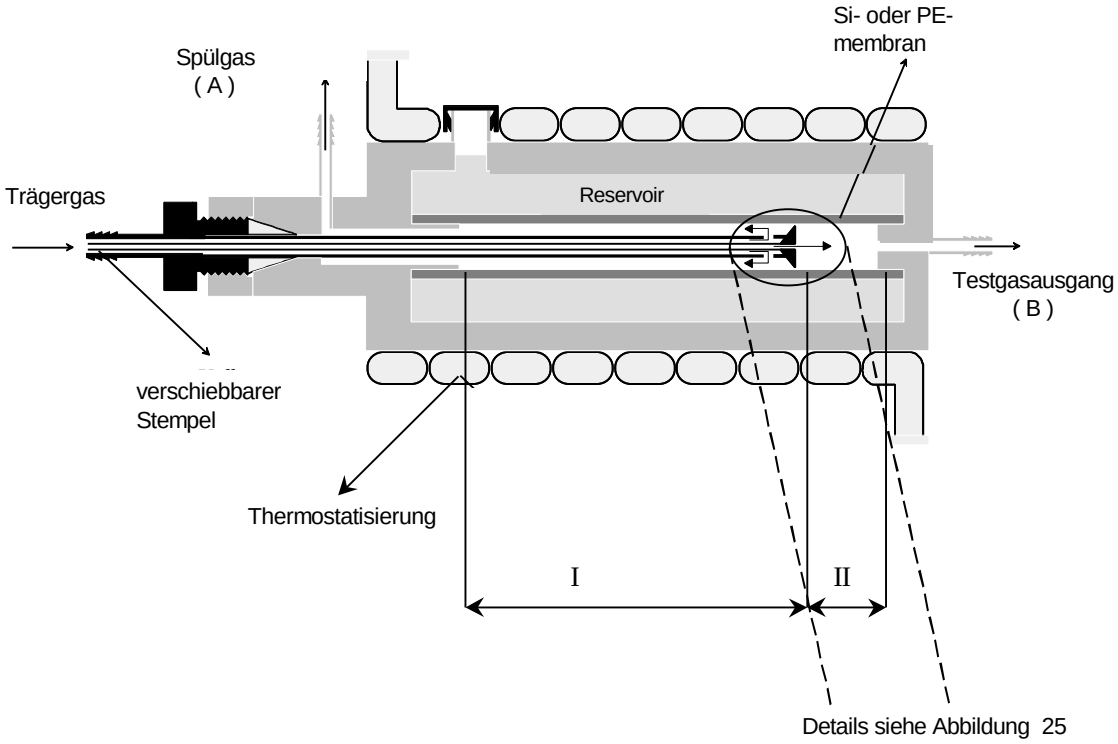

Abb. 26: Testgasquelle auf Permeationsbasis zur Herstellung von Alkoholtestgasen im ppb_v - ppm_v-Bereich [146]

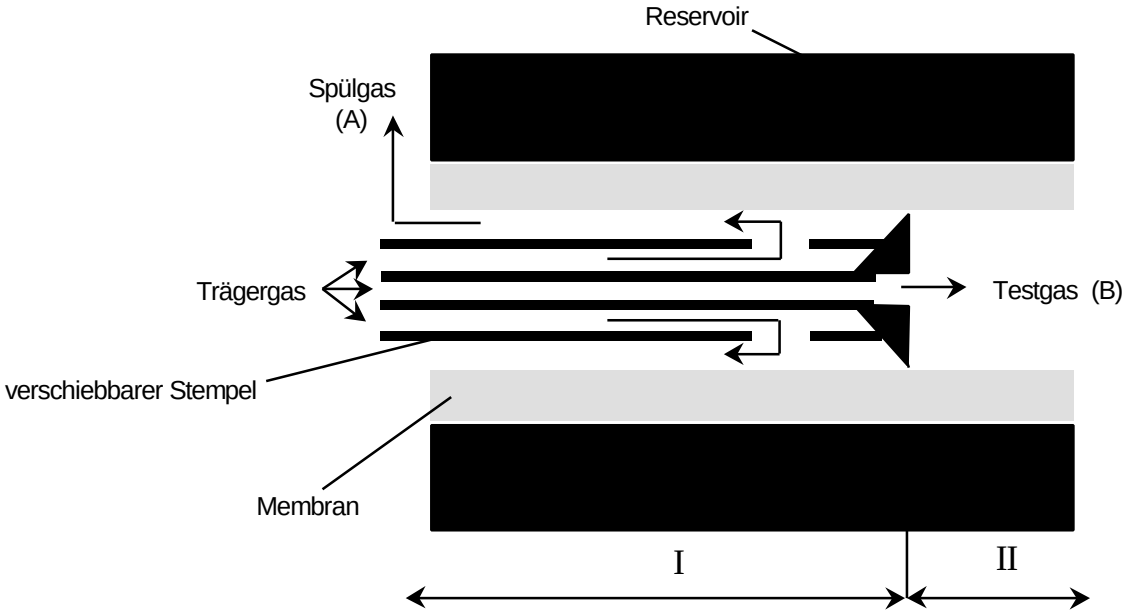

Abb. 27: Vergrößerung des in Abbildung 26 gekennzeichneten Bereichs

Dieser schon für die Herstellung von Formaldehyd- und Schwefeldioxid-Testgasen [146] verwendete Generator basiert auf der Permeation der interessierenden Komponente durch eine Polymermembran in einen Trägergasstrom. Die Permeationsrate ist vom Membranmaterial, von der Temperatur, der Membranfläche und -dicke, der Konzentration der Lösung im Reservoir und gegebenenfalls vom pH-Wert abhängig.

Im Innern des zylindrischen Testgasgenerators befindet sich eine Polymermembran, in diesem Fall ein Silicon- (d = 2 mm) bzw. Polyethylenschlauch (d = 1 mm), dessen innere Oberfläche permanent durch einen Trägergasstrom (N_2) gespült wird. Ein zylindrischer verschiebbarer Stempel im Innern des Schlauches unterteilt dessen innere Oberfläche in zwei Bereiche I und II. Der Stempelstab besteht aus zwei konzentrischen Stahlkapillaren, die als Zuführung für das Trägergas dienen. Die äußere Oberfläche der Polymermembran ist von einer wäßrigen Alkohollösung umgeben. Das Trägergas, welches durch die innere Kapillare aus dem Stempelkopf austritt, transportiert das durch den Bereich II permeierte Gas, welches als Testgas verwendet wird (Ausgang B).

Das Permeat aus dem Bereich I wird durch das Trägergas aus der äußeren Kapillare zum Gasausgang (A) transportiert und zur Reinigung über ein Aktivkohlefilter geleitet. Die gesamte innere Oberfläche der Polymermembran wird ständig durch das Trägergas gespült, so daß das Gleichgewicht der Permeation stets aufrecht erhalten wird. Durch Varriieren der Stempelposition läßt sich somit eine schnelle Änderung der Testgaskonzentration bewirken.

Die Position des Stempels läßt sich in Schritten von 5 mm reproduzierbar verändern. Bei einer Länge des Schlauches von 10 cm kann somit ein Bereich von 1 : 20 zwischen minimalem und maximalem Ausstoß eingestellt werden.

Die Testgaskonzentration läßt sich über die Permeationsrate durch folgende Gleichung berechnen:

$$c_{gas} = 24{,}1 \cdot P \cdot l / Q \qquad (25)$$

c_{gas}	=	Testgaskonzentration / ppb_v
24,1	=	Molvolumen eines idealen Gases / L/mol [T = 21 °C; p = 1 atm]
P	=	Permeationsrate / nmol/min·cm
l	=	Membranlänge (II) / cm
Q	=	Volumenstrom des Gases / L/min

Für die Testgasherstellung von Methanol und Ethanol wurden als Membranmaterialien Silicon- (I.D. = 10 mm; A.D. = 14 mm) und Polyethylenschläuche (I.D. = 10 mm; A.D. = 12 mm) verwendet.

Zur Bestimmung der Permeationsrate wurde das Testgas (Stempelposition = 10 cm) durch zwei hintereinandergeschaltete Waschflaschen (s. Abb. 28), gefüllt mit Phosphatpuffer als Absorberlösung, geleitet.

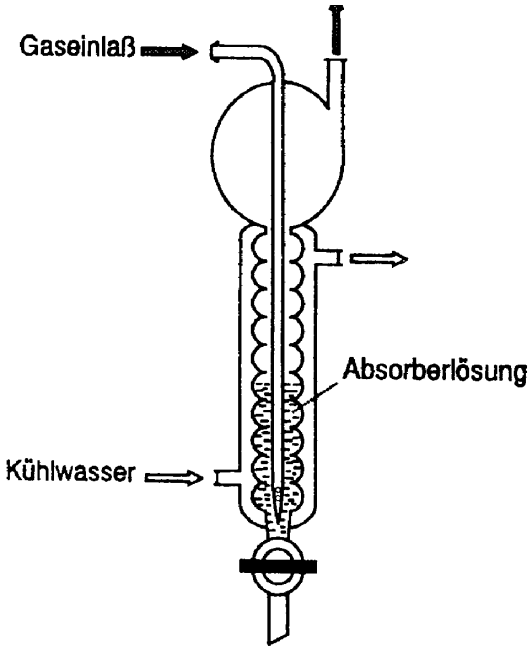

Abb. 28: Verwendete Waschflasche

Die Untersuchungen wurden bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Absorberlösung:	Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 7,4)
Volumen an Absorberlösung:	5 mL
Gasstrom:	20 - 100 L/h
Probenahmezeit:	10 min
Temperatur des Kühlwassers:	14 °C

Nach der Probenahme erfolgte nach einer der vorher beschriebenen Methoden (2.4.) die Analyse der Absorberlösung. Dabei wurden in der zweiten Waschflasche keine meßbaren Alkoholmengen gefunden, so daß von einer quantitativen Absorption in der ersten ausgegangen werden konnte.

Die Permeation eines Stoffes durch eine Membran ist von verschiedenen Parametern, wie z.B. der Konzentration der Alkohollösung im Reservoir und dem Schlauchmaterial, abhängig. Um nun die geeigneten Bedingungen für die Testgasherstellung herauszufinden, wurden verschiedene Konzentrationen an Methanol und Ethanol in Phosphatpuffer eingesetzt.

Abhängigkeit der Permeationsraten von den Konzentrationen der Alkohollösungen im Reservoir der Testgasquelle

Die hierzu durchgeführten Untersuchungen erfolgten für Methanol und Ethanol unter Verwendung von Silicon- und Polyethylenmembranen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 17 mol/L. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

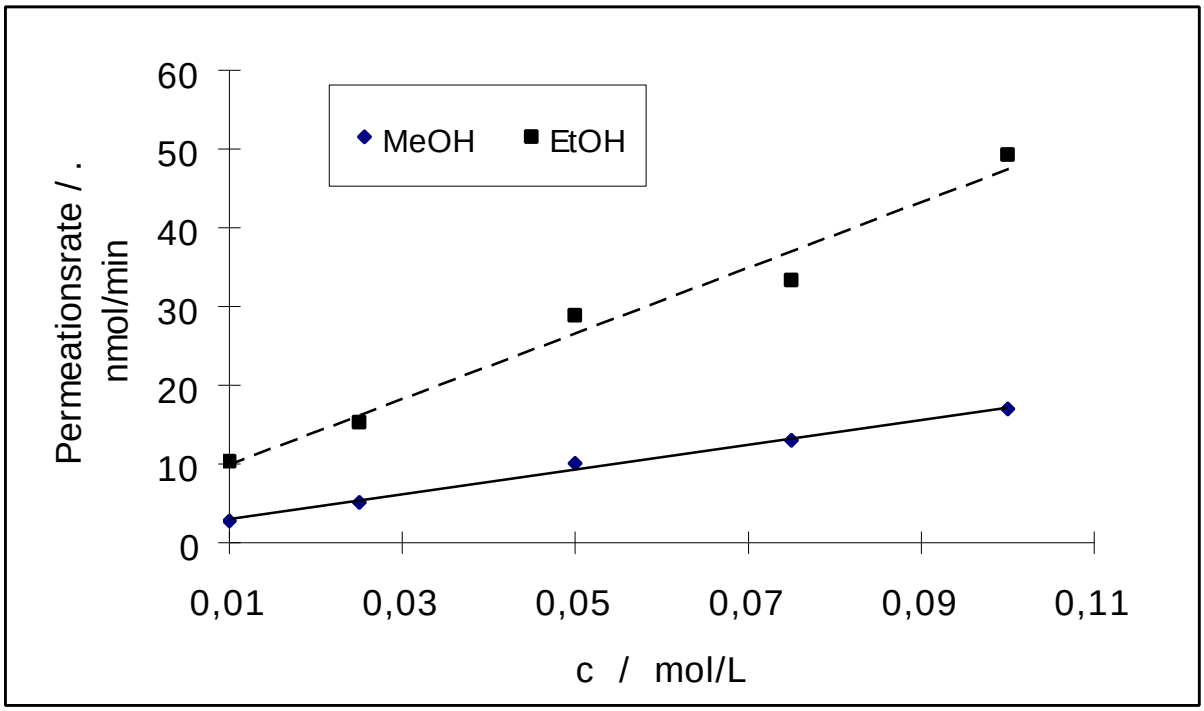

Abb. 29: Abhängigkeit der Permeationsrate von der Alkoholkonzentration unter Verwendung einer Siliconmembran (I.D. = 10 mm; A.D. = 14 mm; Q_{gas} = 60 L/h; T = 21 °C)

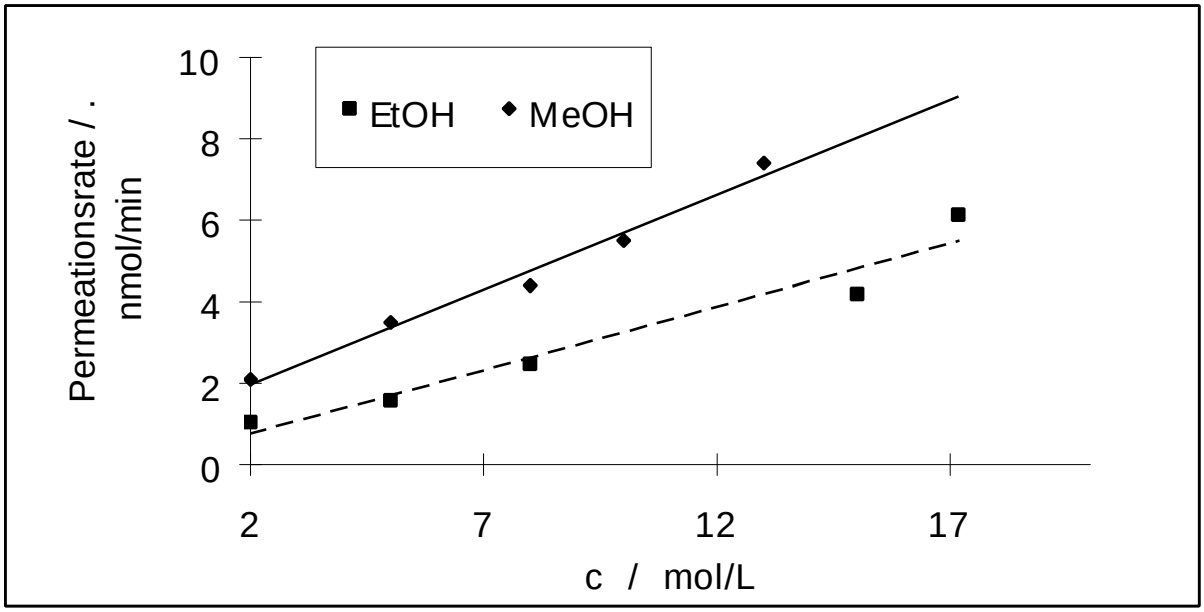

Abb. 30: Abhängigkeit der Permeationsrate von der Alkoholkonzentration unter Verwendung einer Polyethylenmembran (I.D. = 10 mm; A.D. = 12 mm; Q_{gas} = 60 L/h; T = 21 °C)

Aus beiden Abbildungen ist zu erkennen, daß die Siliconmembran für beide Alkohole durchlässiger ist als die Polyethylenmembran. Die mit der Siliconmembran ermittelte Permeationsrate für Methanol ist um den Faktor 300 größer als die mit der Polyethylen-membran bestimmte. Für Ethanol sind die Größenunterschiede noch erheblicher. Hier gelangt 1600 mal mehr Ethanol durch die Silicon- als durch die Polyethylenmembran.

Bei Verwendung einer Siliconmembran (d = 2 mm) ist die Permeationsrate für Ethanol um den Faktor 3 größer als für Methanol. Bei Einsatz einer Polyethylenmembran (d = 1 mm) dagegen liegen die Verhältnisse umgekehrt. Hier ist die Permeationsrate für Ethanol um den Faktor 2 kleiner als für Methanol.

Die Standardabweichungen der Permeationsraten für Methanol und Ethanol waren für die Polyethylenmembran mit 10 bis 15 % größer als für die Siliconmembran (4 bis 6 %), so daß im weiteren Verlauf der Arbeit die Siliconmembran zur Testgaserzeugung verwendet wurde.

Einlaufzeit der Testgasquelle

In Abb. 31 ist die Permeationsrate von Ethanol durch einen Siliconschlauch in Abhängigkeit von der Zeit nach Befüllen der Testgasquelle mit 0,01 molarer Ethanollösung dargestellt.

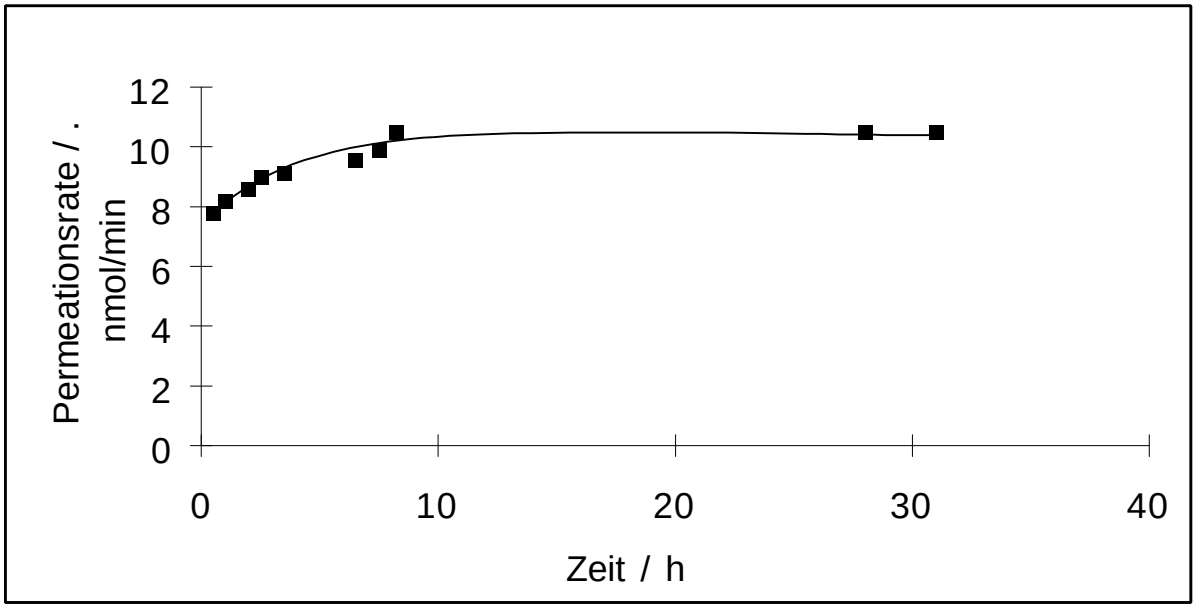

Abb. 31: Permeationsrate als Funktion der Einlaufzeit der Testgasquelle bei der Erzeugung von Ethanoltestgas. $c(EtOH_{li})$ = 0,01 mol/L; Q_{gas} = 60 L/h; T = 21 °C; Siliconmembran (I.D. = 10 mm; A.D. = 14 mm)

Bis zum Erreichen stationärer Bedingungen nach Befüllen des Generators ist ungefähr eine Zeit von 10 Stunden erforderlich; daher ist eine Änderung der Alkoholkonzentration im Reservoir nur bei Abdeckung eines größeren Konzentrationsbereiches sinnvoll. Zur schnellen Veränderung von Testgaskonzentrationen in kleineren Bereichen eignet sich hingegen die Verschiebung der Stempelposition, da hierbei das Gleichgewicht der Permeation unbeeinflußt bleibt. Kalibrierungen mit Hilfe der hier untersuchten Testgasquelle werden in Abschnitt 3.4.3. beschrieben.

3.3. Entwicklung einer diskontinuierlichen Probenahmemethode zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft

Wie bereits erwähnt, erlaubt die Verfügbarkeit von Methoden zur Bestimmung von Alkoholen in wässrigen Medien die Annahme, Alkohole aus der Gasphase in wässrigen Lösungen anreichern und anschließend messen zu können.

Verwendung einer Glas-Wendel zur Probenahme

Bei Lazrus et al. [87] ist ein Verfahren zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid und Formaldehyd beschrieben, bei dem Luft und Absorberlösung gleichzeitig durch eine Wendel aus Glasrohr geführt werden. Die Absorberlösung bildet an der inneren Glasoberfläche einen Film aus, der eine große Oberfläche für den Gasaustausch bietet. In einem vertikalen Glasrohr am Ende der Wendel werden Gas und Flüssigkeit getrennt. Dieses System bietet die Möglichkeit der kontinuierlichen Anreicherung von Substanzen aus Luft. Es wurde modifiziert und für die Anreicherung von Methanol und Ethanol aus Luft eingesetzt.

Die Wendel (s. Abb. 32) besteht aus einem in 10 Windungen angeordneten Glasrohr (I.D. = 2 mm; l = 100 mm). Das vertikale Glasrohr am Ausgang dient der Gas/Flüssigkeit-Trennung und besitzt einen inneren Durchmesser von 6 mm.

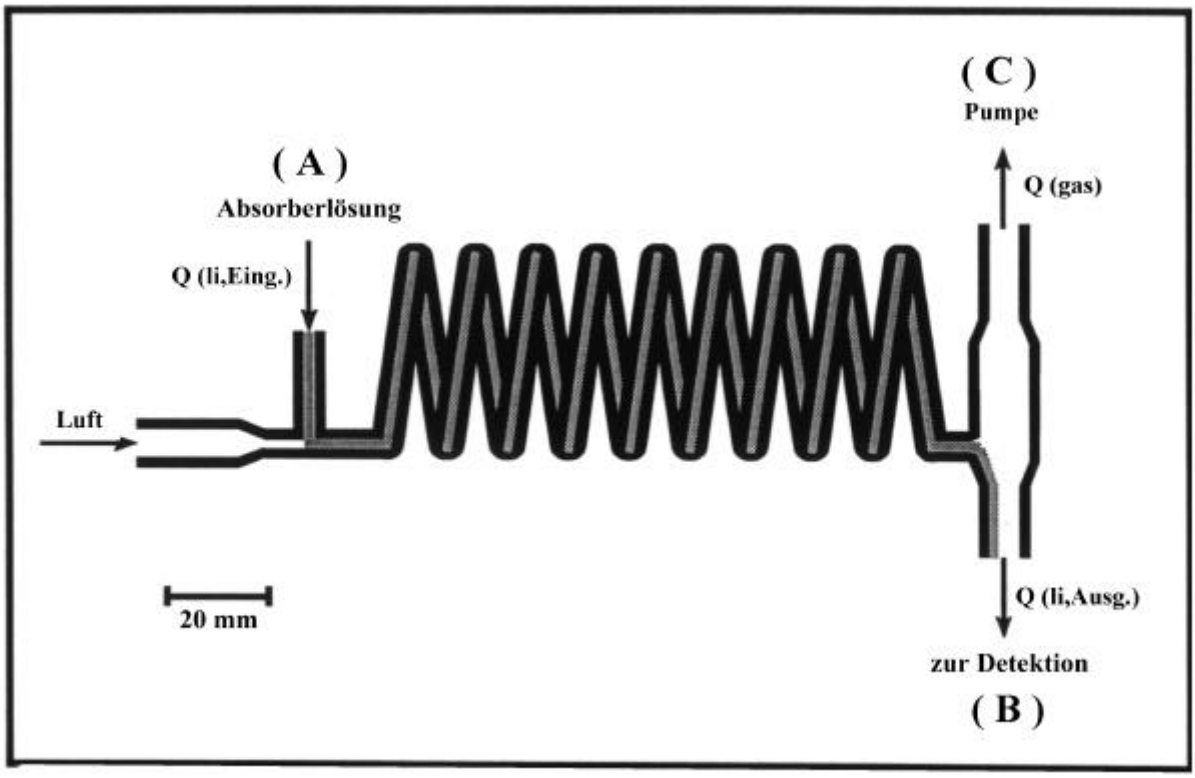

Abb. 32: Absorber-Wendel (I.D. = 2 mm ; l = 100 mm; 10 Windungen)

Nach Analyse der abfließenden Absorberlösung (B) läßt sich die Konzentration der Alkohole in der Gasphase anhand folgender Gleichung berechnen:

$$c_{gas} = c_{li} \cdot Q_{li;B} / Q_{gas} \cdot S_{eff} \qquad (26)$$

c_{gas} = Alkoholkonzentration in Luft / µmol/L

c_{li} = Alkoholkonzentration in der Absorberlösung / µmol/L

$Q_{li;B}$ = Volumenstrom der Absorberlösung am Ende der Wendel / L/min

Q_{gas} = Volumenstrom der angesaugten Luft / L/min

S_{eff} = Sammeleffizienz

Wichtig für eine Absorption der gasförmigen Komponente in dem Flüssigkeitsfilm ist das Verhältnis von Q_{li}/Q_{gas} in der Wendel. Kleinere Verhältnisse bedeuten nach obiger Gleichung ein geeigneteres Nachweisvermögen. Hierbei ist der Flüssigkeitsabfluß am Ausgang maßgebend, da ein Teil der Absorberlösung während der Probenahme verdampft.

Die Menge an verdampfter Lösung ist von der relativen Feuchte, der Temperatur und dem Volumenstrom der Luft abhängig. In den weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Sammeleffizienz des Probenahmesystems untersucht.

Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Methanol und Ethanol vom Gasfluß durch die Absorberwendel

Der Gasfluß durch den Scrubber entscheidet über die Kontaktzeit zwischen Gasphase und Flüssigkeitsfilm. Für den Übergang von Alkohol aus der Gas- in die Flüssigphase müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Die Alkoholmoleküle müssen während ihres Aufenthaltes in der Wendel zur Wand diffundieren und die Phasengrenze Luft/Lösung überwinden können. Es existiert somit ein maximaler Fluß Q_{gas}, über den hinaus eine hohe Sammeleffizienz nicht mehr zu erwarten ist.

Folgender Versuchsaufbau wurde gewählt, um den Einfluß des Gasstromes auf die Sammeleffizienz zu überprüfen: Die in Abb. 26 gezeigte Testgasquelle wurde mit der Glas-Wendel (s. Abb. 32), durch die eine phosphatpufferhaltige Absorberlösung gepumpt wurde, verbunden. Zur Bestimmung der Sammeleffizienz befand sich hinter der Absorber-Wendel eine Waschflasche. Die Proben wurden anschließend fluorimetrisch detektiert.

Um den Einfluß des Gas-Durchflusses auf die Sammeleffizienz zu überprüfen, wurde dieser im Bereich von 20 bis 100 L(Luft)/h variiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 zu sehen.

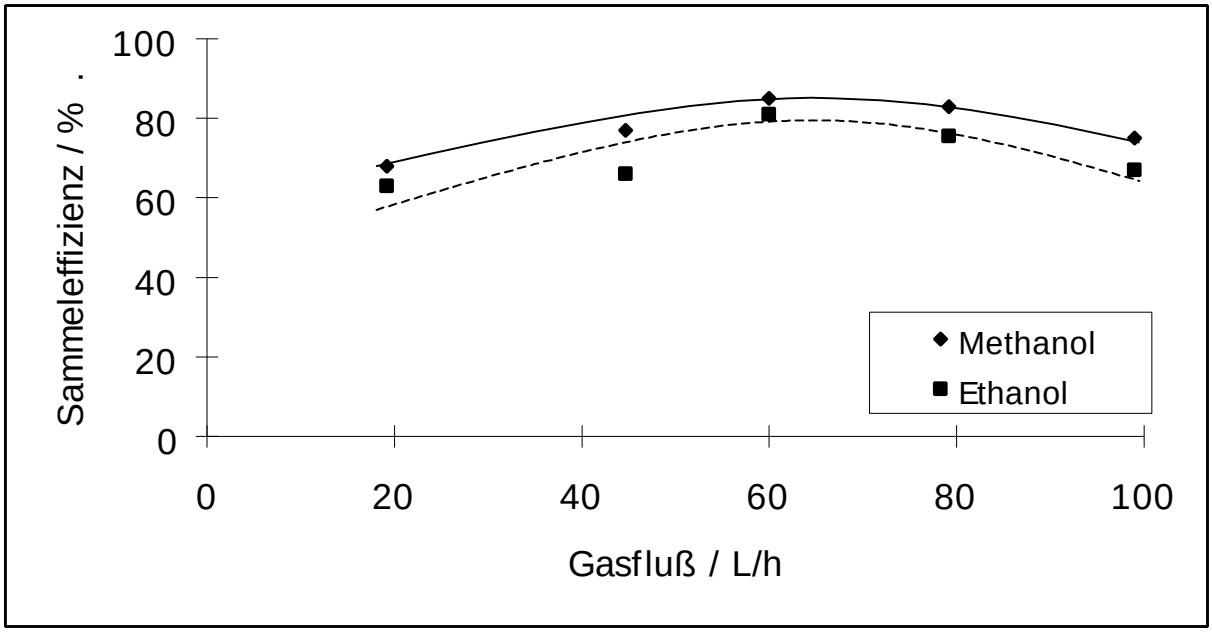

Abb. 33: Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Ethanol(gas) und Methanol(gas) vom Gasdurchfluß durch die Wendel. $Q_{i;Eing.(A)}$ = 230 µL/min; c_{EtOH} = c_{MeOH} = 50 ppb_v; Absorberlösung: Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); pH = 7,4; T = 21 °C

Bis zu einem Gasfluß von 60 L/h ist für beide Alkohole eine Zunahme der Sammeleffizienz bis ca. 80 % zu erkennen, die zu höheren Gasflüssen hin wieder abnimmt. Bei geringeren Gasströmen bis zu ca. 60 L/h ist möglicherweise noch kein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm ausgebildet. Mit steigenden (> 60 L/h) Gasflüssen wird die Kontaktzeit von Gas und Flüssigkeit und damit die Zeit für den Phasenübergang immer geringer. Für die weiteren Untersuchungen wurde ein Volumenstrom von 60 L/h gewählt.

Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Methanol und Ethanol vom Flüssigkeitsstrom durch die Glas-Wendel

Voraussetzung für eine maximale Sammeleffizienz für Alkohole ist die Ausbildung eines gleichmäßigen Flüssigkeitsfilmes durch die Glas-Wendel. Die Ergebnisse der Untersuchung der Abhängigkeit der Sammeleffizienzen vom Flüssigkeitsstrom durch die Wendel sind für den Bereich von 100 bis 1100 µL(Absorberflüssigkeit)/min in Abb. 34 dargestellt.

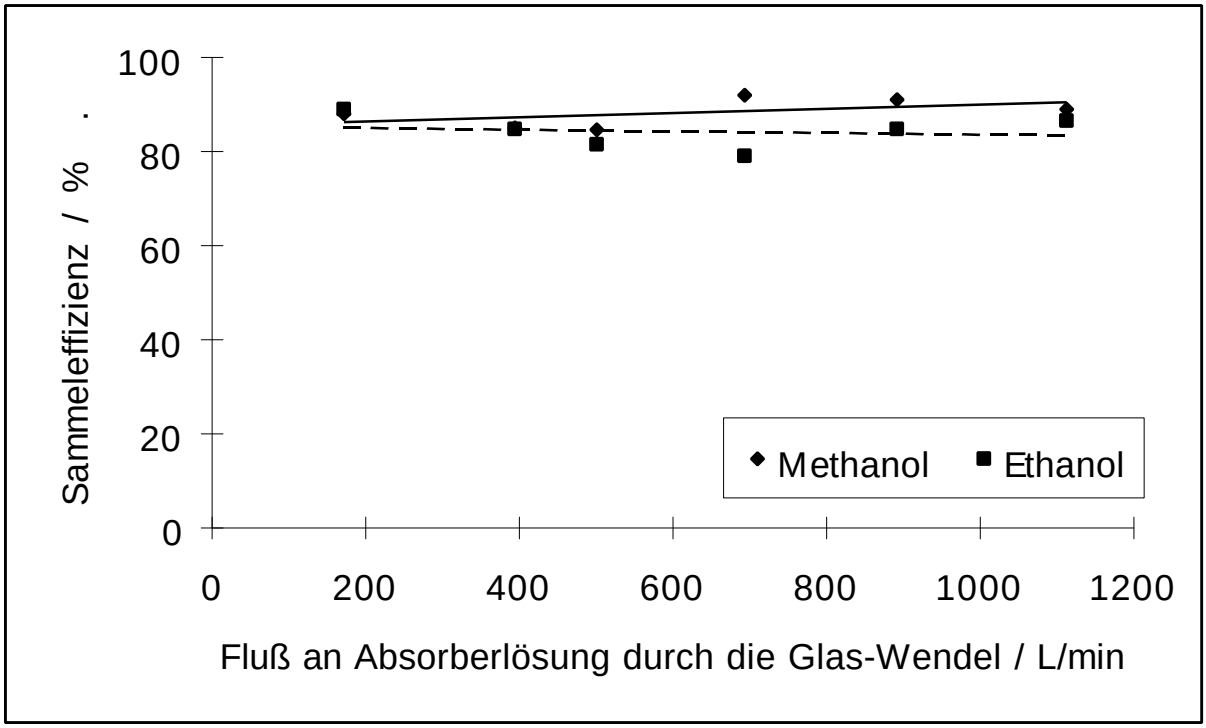

Abb. 34: Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Methanol(gas) und Ethanol(gas) vom Durchfluß an Absorberlösung durch die Wendel. Q_{gas} = 60 L/h; Absorberlösung: Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 7,4)

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß die Veränderung des Volumenstromes der Flüssigkeit keinen signifikanten Einfluß auf die Sammeleffizienzen an Methanol und Ethanol ausübt. Dies erlaubt den Schluß, daß im wesentlichen die Homogenität des an der inneren Glasoberfläche ausgebildeten Flüssigkeitsfilms für den Gasaustausch wichtig ist, während die Filmdicke praktisch keinen Einfluß hat.

Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Methanol und Ethanol von der Temperatur

Nach dem Henry´schen Gesetz [147] ist die Konzentration eines in einer Flüssigkeit gelösten Gases im Gleichgewicht proportional zu seinem Partialdruck über der Flüssigkeit. Es gilt strenggenommen nur bei niedrigen Drücken und verdünnten Lösungen. Die Henry-Konstante ist temperaturabhängig, sie nimmt in der Regel mit steigender Temperatur deutlich ab.

Um den Einfluß der Temperatur auf die Sammeleffizienz zu überprüfen, wurde die Glas-Wendel während der Probenahme in einem Wasserbad thermostatiert. Die genaue Temperatur der Absorberlösung im Inneren der Wendel konnte hierbei nicht gemessen werden. Es ist aber anzunehmen, daß während der Probenahme die Temperatur der Lösung aufgrund von partieller Verdampfung von Wasser etwas geringer war als die Temperatur des Wasserbades.

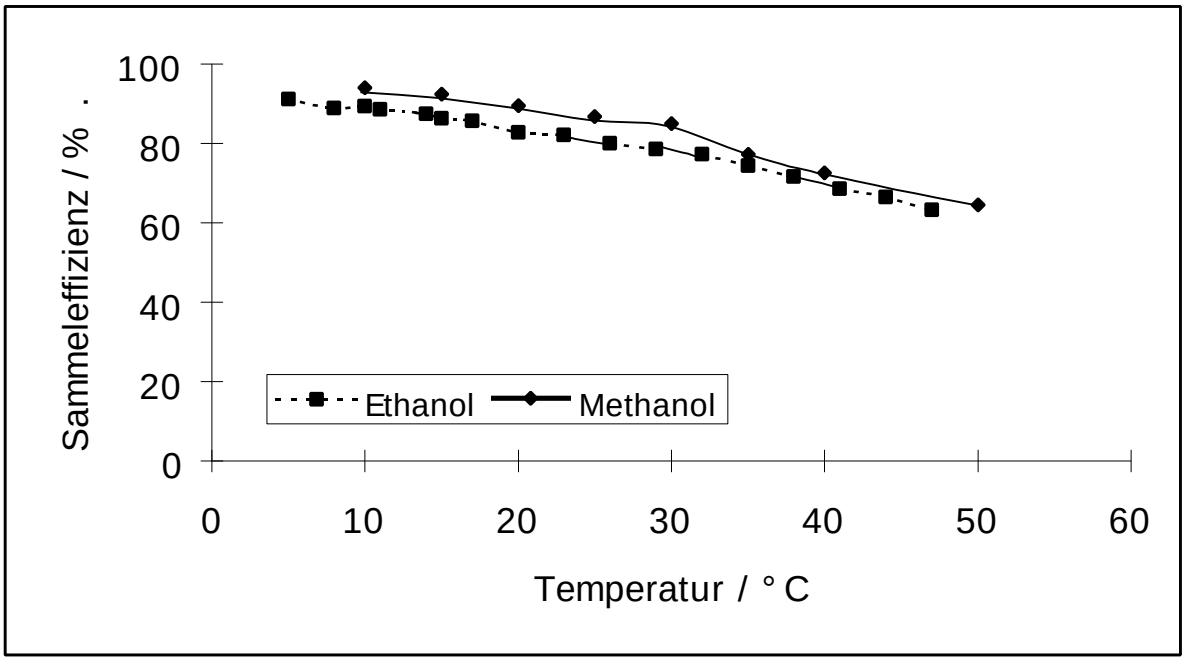

Abb. 35: Abhängigkeit der Sammeleffizienz für Methanol und Ethanol von der Temperatur. Q_{gas} = 60 L/h; $Q_{li;Eing.(A)}$ = 230 µL/min; rel. Feuchte ca. 0 %

Abb. 35 bringt die Abnahme der Sammeleffizienz für die gasförmigen Alkohole bei Verwendung von Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L) mit zunehmender Temperatur deutlich zum Ausdruck.

Um nun eine möglichst hohe Sammeleffizienz bei vertretbarem Aufwand zu erreichen, wurde die Glas-Wendel für die Probenahme der gasförmigen Alkohole auf 10 °C gekühlt (s. Abb. 36). Hierbei wurden Ausbeuten von 94,6 ± 5,7 % für Methanol und von 89,4 ± 5,2 % für Ethanol erhalten.

Mit Hilfe der bis zu diesem Punkt gewonnenen Erkenntnisse wurde eine Apparatur für Feldmessungen konstruiert und später auch erfolgreich für Messungen in Brasilien eingesetzt.

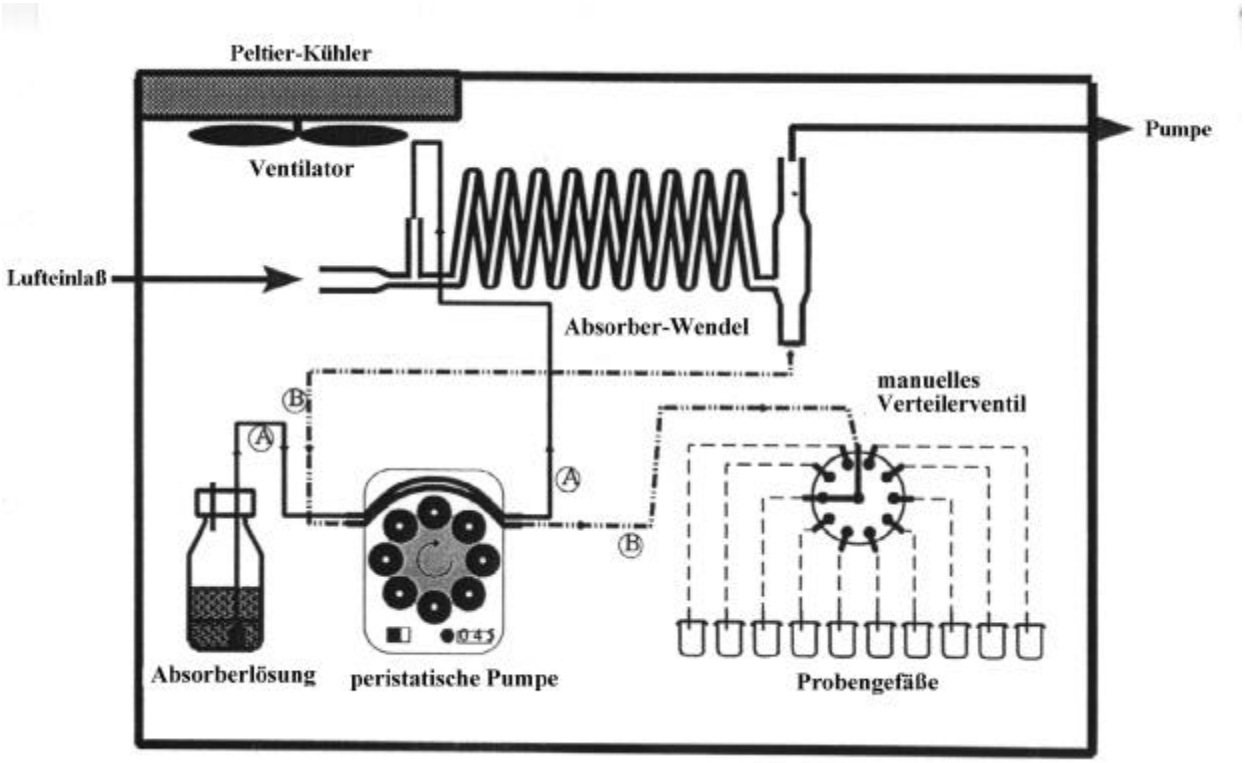

Abb. 36: Schematischer Aufbau der diskontinuierlichen Probenahme von Methanol und Ethanol aus Außenluft

Die in Abbildung 36 skizzierte Apparatur besteht aus einer Kühlbox aus Kunststoff (50 L), einer sog. Campingbox, in welcher mittels Peltier-Kühlung eine Temperatur von 10 °C aufrecht erhalten werden kann. In der Kühlbox befinden sich die Glas-Wendel, ein Vorrat an Absorberlösung, eine Mehrkanal-Schlauchpumpe und die Probengefäße. Eine Membranpumpe, die sich außerhalb der Box befindet, saugt Außenluft mit einer Rate von 60 L/h durch die Wendel, durch welche gleichzeitig mit Hilfe einer Schlauchpumpe Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L; pH = 7,4) gefördert wird ($Q_{li;Eing.(A)}$ ca. 200 µL/min). Die Absorberlösung wird durch ein manuelles Verteilerventil auf die einzelnen Sammelgefäße verteilt. Membranpumpe, Schlauchpumpe und Peltierelement sind jeweils für 12 V Betriebsspannung ausgelegt, so daß sie sich über Batterien versorgen und netzunabhängig im Feld verwenden lassen.

Die Proben können bis zur Analyse in der Kühlbox bei 10 °C aufbewahrt werden. Ihre Volumina werden im Labor durch Wägung ermittelt, anschließend erfolgt die Analyse. Diese kann nach den in den Abschnitten 2.1. und 2.2. beschriebenen Methoden durchgeführt werden:

a) Methanol und Ethanol können nach chromatographischer Trennung und Nachsäulen-derivatisierung mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase und anschließender fluorimetrischer Detektion bestimmt werden.

Hiermit können folgende Nachweisgrenzen erzielt werden:

Methanol: 6,03 ppb_v

Ethanol: 21,10 ppb_v

b) Ethanol kann direkt mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase und des Coenzyms NAD^+ fluorimetrisch detektiert werden.

Hiermit kann folgende Nachweisgrenze erzielt werden:

Ethanol: 3,93 ppb_v

Bezüglich der Kalibrierung der Verfahren mit Hilfe der unter Abschnitt 3.2 beschriebenen Testgasquelle wird auf Abschnitt 3.4.3 verwiesen.

3.4. Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Bestimmung von Ethanol in Außenluft

Die in Abb. 36 beschriebene Probenahmemethode mit nachfolgender Analyse stellt ein diskontinuierliches Bestimmungsverfahren für Methanol und Ethanol in Luft dar. Das bedeutet, daß Probenahme und Konzentrationsbestimmung der Alkohole nur zeitlich getrennt voneinander erfolgen können. Eine direkte Kopplung von Probenahme und Analyse ermöglicht hingegen eine kontinuierliche Konzentrationsbestimmung im Fließsystem. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, die die kontinuierliche Bestimmung von Ethanol in Luft erlaubt. Der schematische Aufbau ist in Abb. 37 dargestellt.

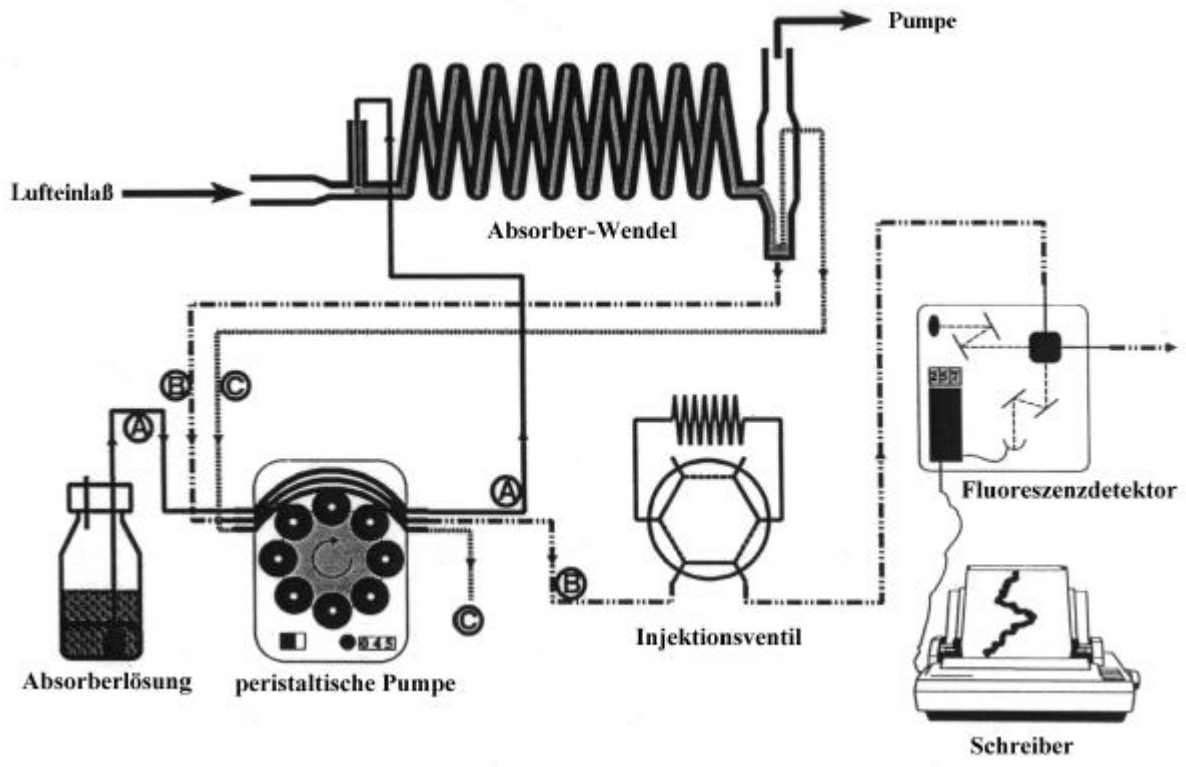

Abb. 37: Schematischer Aufbau zur kontinuierlichen Bestimmung von Ethanol in Luft

Bei dieser Methode sind die Absorber-Wendel zur Probenahme von Luft und der Fluoreszenzdetektor direkt gekoppelt. Die Absorberlösung enthält die in wässrigem Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L) gelösten Reagenzien ADH und NAD^+. Während der Probenahme von Luft kann Ethanol mit ADH und NAD^+ zum Reaktionsprodukt NADH reagieren, welches anschließend fluorimetrisch detektiert wird. Eine Mehrkanalpumpe transportiert die Absorberlösung in die Wendel (Fluß A) und die das Reaktionsprodukt NADH enthaltende Lösung direkt in den Fluoreszenzdetektor (Fluß B). Der Volumenstrom (B) ist aufgrund von Verdampfungseffekten während der Probenahme - abhängig von Temperatur und relativer Feuchte der Luft - kleiner als der Fluß (A). Um sicherzustellen, daß keine Gasblasen in den Fluoreszenzdetektor gelangen, die die Bestimmung stören würden, muß die Flußrate (B) auf einen entsprechend kleinen Wert eingestellt werden. Das Volumen des Überlaufs (C) wird nach bestimmten Zeitintervallen durch Wägung bestimmt. Dies ist notwendig, um die Volumenflüsse (B) und (C) bilanzieren zu können.

Die Konzentration an gasförmigem Ethanol läßt sich nach folgender Gleichung ermitteln:

$$c_{gas} = c_{li} \cdot (Q(_{li;B}) + Q(_{li;C})) / (Q_{gas} \cdot S_{eff}) \qquad (27)$$

c_{gas} = Ethanolkonzentration in Luft / µmol/L

c_{li} = Ethanolkonzentration in der Absorberlösung / µmol/L

$Q_{li;B}$;$Q_{li;C}$ = Flüssigkeitsströme der Absorberlösung am Ausgang der Glas-Wendel/ L/min

Q_{gas} = Probenahme-Fluß der Außenluft / L/min

S_{eff} = Sammeleffizienz

Eine Flüssigphasenkalibration des beschriebenen Probenahmesystems kann durch Injektion von Lösungen, die die Reagenzien ADH und NAD^+ und selbst hergestellte Ethanolverdünnungen enthalten, in den Flüssigkeitsstrom vor dem Fluoreszenzdetektor erfolgen. Die Reagenz-konzentrationen entsprechen denen, die in der durch die Wendel geleiteten Absorberlösung vorliegen.

3.4.1. Untersuchung der Arbeitsparameter

Zur Optimierung der kontinuierlichen Bestimmung von Ethanol in Luft wurde der Einfluß folgender Parameter untersucht:

- Reagenzkonzentrationen (NAD^+; ADH)
- Gasfluß durch die Wendel
- Volumenstrom der Absorberlösung
- Verdampfung von Wasser aus der Absorberlösung in Abhängigkeit von der Temperatur

Einfluß der Reagenzkonzentrationen

Die Konzentrationen an ADH und NAD^+ in der durch die Glas-Wendel geleiteten Absorberlösung (Fluß A) wurden im Bereich von 0,2 bis 4 mmol(NAD^+)/L und 2 bis 30 U(ADH)/mL variiert. Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden mit Testgaskonzentrationen von 50 ppb_v und 0 ppb_v (nur Trägergas) gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 38 für NAD^+ und in Abb. 39 für ADH zu sehen.

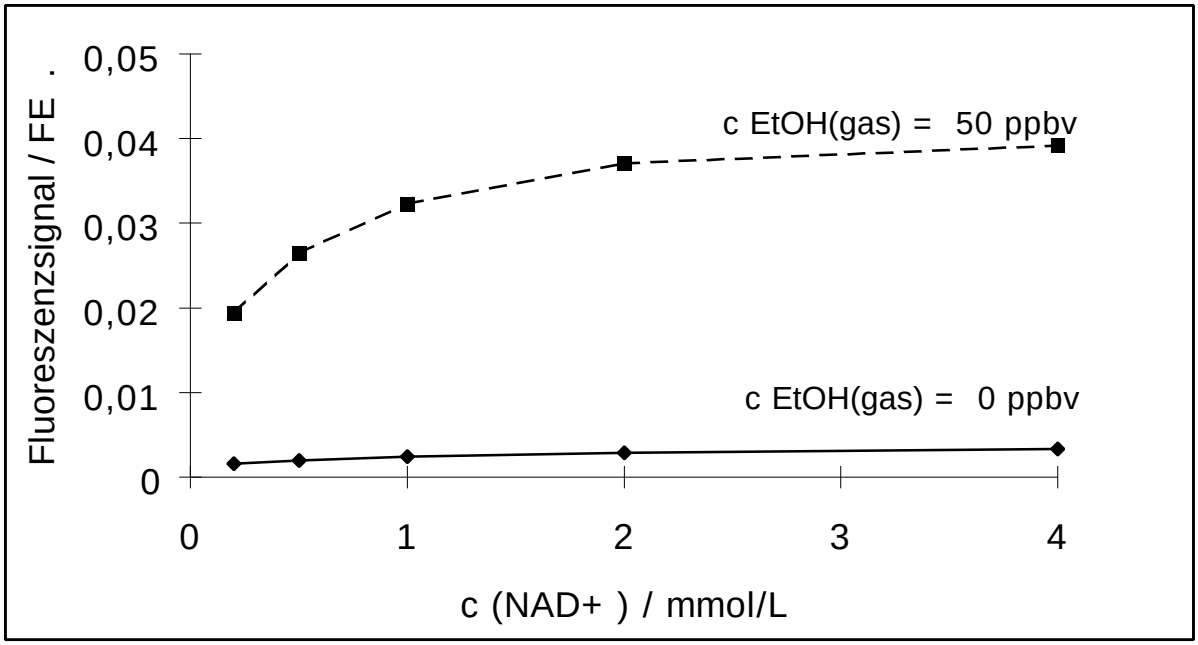

Abb. 38: Einfluß der NAD^+-Konzentration auf das Fluoreszenzsignal bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen in der Gasphase. Absorberlösung: c(ADH) = 15 U/mL; NAD^+; Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); pH = 9,0; $Q_{li;Eing.(A)}$ = 205 µL/min; $Q_{li;Ausg.(B)}$ = 150 µL/min; Q_{gas} = 60 L/h; T = 21 °C; rel. Feuchte = 70 %

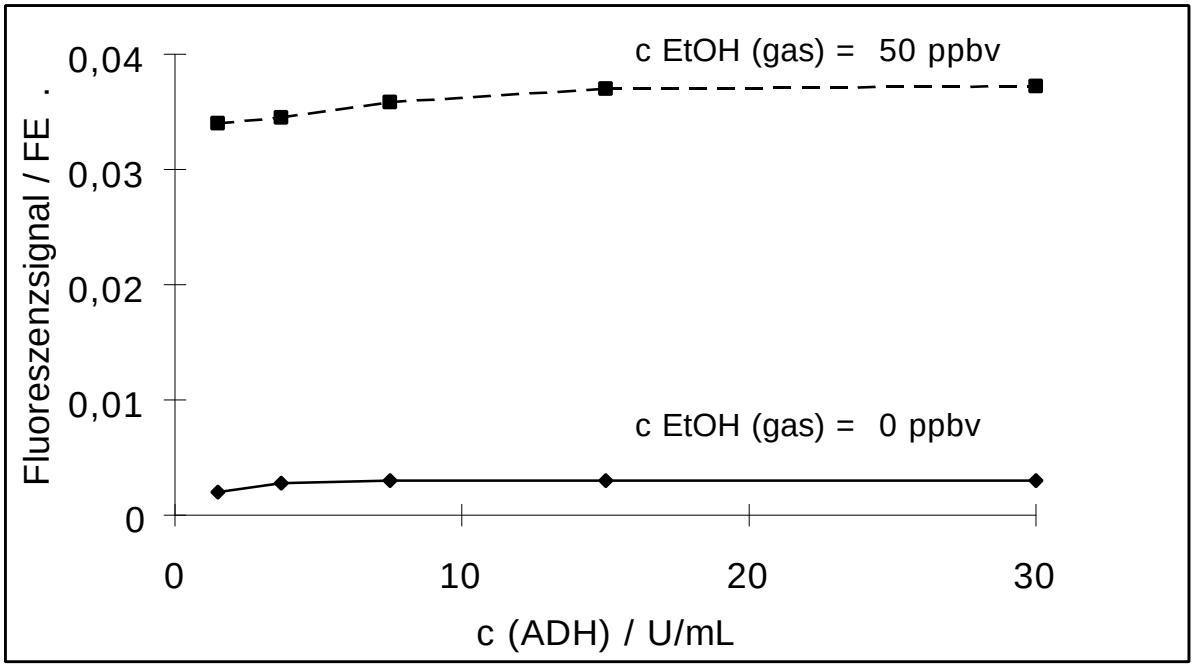

Abb. 39: Einfluß der ADH-Konzentration auf das Fluoreszenzsignal bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen in der Gasphase. Absorberlösung: $c(NAD^+)$ = 2 mmol/L; ADH; Phosphatpuffer (c = 0,1 mol/L); pH = 9,0; $Q_{li;Eing.(A)}$ = 205 µL/min; $Q_{li;Ausg.(B)}$ = 150 µL/min; Q_{gas} = 60 L/h; T = 21 °C; rel. Feuchte = 70 %

Wie zu erkennen, sind die höchsten Signale bei Konzentrationen ab 2 mmol/L NAD^+ und 15 U/mL ADH zu finden. Allerdings kommt es bei diesen Konzentrationen zu einem Auskristallisieren von Reagenz, welches auf die teilweise Verdampfung von Wasser während der Probenahme zurückgeführt werden kann. Das feste Material kann zu einer Verstopfung der Verbindung von Glas-Wendel und Detektor führen. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen Reagenzkonzentrationen von $c(NAD^+)$ = 1 mmol/L und c(ADH) = 7,5 U/mL gewählt. Dies gewährleistet einen kontinuierlichen Meßbetrieb, auch wenn die resultierenden Signale etwas geringer ausfallen.

Volumenstrom von Meßgas (Luft) bzw. Testgas (Luft als Trägergas)

Grundsätzlich hat, wie schon in Abb. 33 zu sehen, der für die Probenahme gewählte Volumenstrom einen Einfluß auf das Absorptionsverhalten eines Spurengases. Die Abhängigkeit der Sammeleffizienz vom Gasfluß ist im Bereich von 10 bis 150 L/h in Abbildung 40 dargestellt.

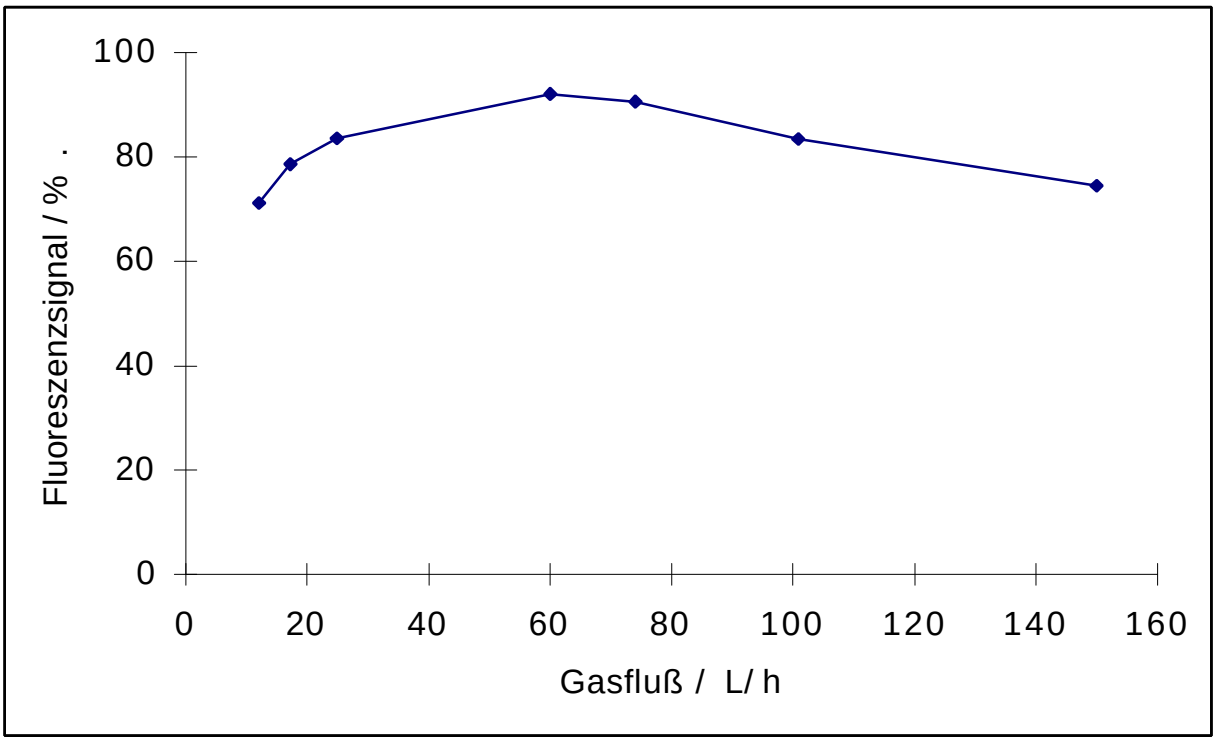

Abb. 40: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals für Ethanol vom Gasstrom durch die Glas-Wendel. $Q_{li;Eing.(A)}$= 230 µL/min; $Q_{i;Ausg.(B)}$ = 150 µL/min; c(NAD^+) = 1 mmol/L; c(ADH) = 7,5 U/mL; T = 21 °C; rel. Feuchte = 70 %

Das Fluoreszenzsignal steigt bis zu einem maximalen Wert bei 60 L/h an und nimmt mit größer werdenden Flußraten im untersuchten Bereich bis 150 L/h wieder ab. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem in Abb. 33 gezeigten.

Die Variation des Volumenstroms (100 - 800 µL/min) der Absorberlösung hatte keinen Einfluß auf die Sammeleffizienz. Jedoch nimmt mit zunehmendem Durchfluß die Höhe des Fluoreszenzsignals ab, da es hierbei zu einer Verdünnung des gebildeten NADHs in der Lösung (B) kommt.

Bei diesen Untersuchungen wurde die Sammeleffizienz mit Hilfe einer mit wässriger Phosphatpufferlösung (c = 0,1 mol/L) gefüllten Waschflasche (s. Abb. 28) hinter der Glas-Wendel und anschließende Analyse der Absorberlösung bestimmt. Bei einem Gasfluß von 60 L/h ergab sich für Ethanol eine Sammeleffizienz von 92,1 ± 6,1 % (n = 8).

Verdampfung von Wasser aus der Absorberflüssigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur

Wie schon erwähnt, tritt während der Probenahme eine Verdampfung von Wasser aus der Absorberflüssigkeit ein, die vom Durchfluß des Meß- bzw. Trägergases, der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig ist. Um zu gewährleisten, daß der Flüssigkeitsfluß (B) am Ausgang der Wendel keine Gasblasen enthält, muß er geringer sein als der um die Verdampfungsverlusten korrigierte Eingangsfluß (A). Die Verluste an Wasser aus der Absorberlösung wurden als Funktion der Temperatur bei einem Gasdurchfluß von 60 L/h und ca. 0 % rel. Feuchte durch Ermittlung der Volumina der Ströme (B) und (C) über einen Zeitraum von 10 min und anschließende Wägung ermittelt. Hierzu wurde das Probenahmesystem mittels eines temperierbaren Heizschlauches thermostatiert.

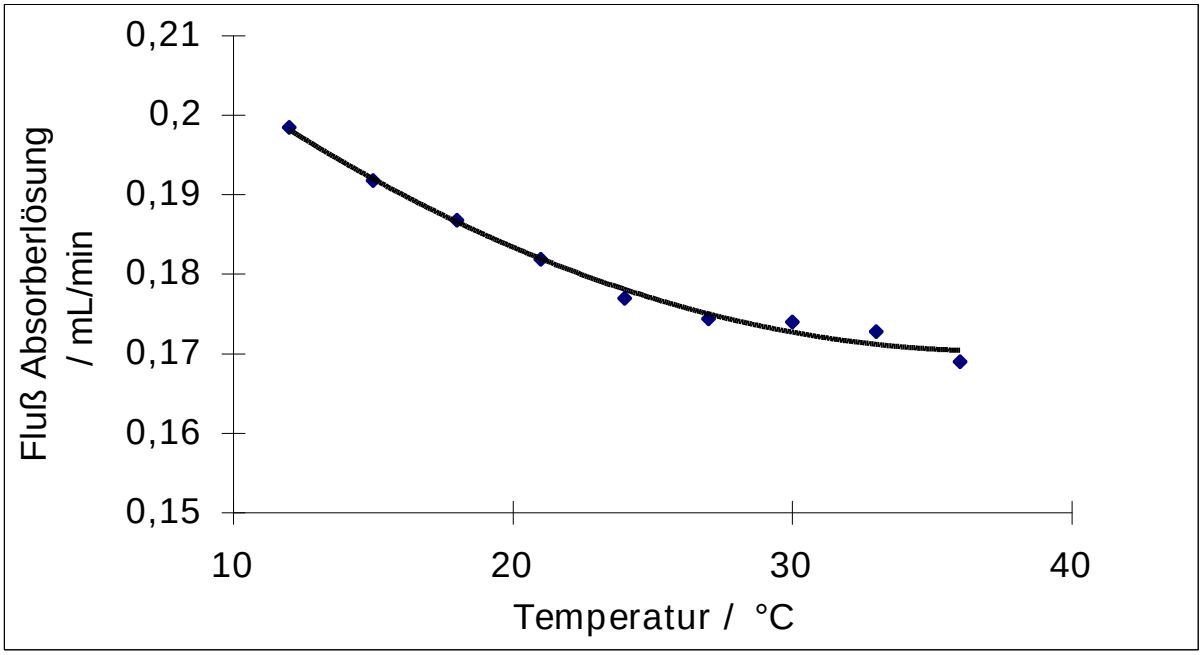

Abb. 41: Abhängigkeit des Flusses an Absorberlösung am Ausgang der Glas-Wendel von der Temperatur. $Q_{li;Eing.(A)}$ = 205 µL/min; Q_{gas} = 60 L/h; rel. Feuchte ca. 0 %

Wie zu erwarten, ist mit Zunahme der Temperatur eine erhöhte Verdampfung an Wasser verbunden, die einmal für die Einstellung des Flusses (B) und zum anderen für die Ermittlung der Ethanolkonzentration unter zusätzlicher Berücksichtigung des Flusses (C) – s. Abb. 37 und Gleichung (27) – relevant ist.

Unter üblicherweise anzutreffenden atmosphärischen Bedingungen mit relativen Feuchten von 50 bis 100 % sind deutlich geringere Verluste als bei den experimentell gewählten Bedingungen von ca. 0 % zu erwarten. Eine Flußrate von 150 µL/min gewährleistet demnach einen von Gasblasen freien Flüssigkeitsstrom (B).

Mit dem kontinuierlichen Verfahren konnte eine Nachweisgrenze an Ethanol von 2,38 ppb_v erzielt werden.

3.4.2. Untersuchung des Einflusses von Ozon auf die Ethanolbestimmung

Im Hinblick auf die Bestimmung von Ethanol in Außenluft müssen die Einflüsse anderer relevanter atmosphärischer Spurengase untersucht werden. Aufgrund der hohen Selektivität des Enzyms Alkoholdehydrogenase sind Störungen durch Substanzen, die mit NAD^+ zum Reaktionsprodukt NADH reagieren können, nicht zu erwarten. Die Bestimmung von Ethanol in Luft kann jedoch durch atmosphärische Bestandteile beeinflußt werden, die die Reagenzien zerstören oder während der Probenahme mit Ethanol reagieren. In beiden Fällen würde dies zu falschen Resultaten führen. Vor allem wegen seiner oxidativen Reaktivität ist hier Ozon als bedeutsam anzusehen, da es in bestimmten Regionen im Sommer Konzentrationen von mehr als 100 ppb_v erreichen kann [148,149].

Mit Hilfe von Ozontestgas unterschiedlicher Konzentrationen, das am Eingang der Glas-Wendel dem Trägergas zugemischt wurde, sollten mögliche Einflüsse des Ozons festgestellt werden. Das Ozontestgas wurde mittels des in Abb. 42 dargestellten Generators hergestellt.

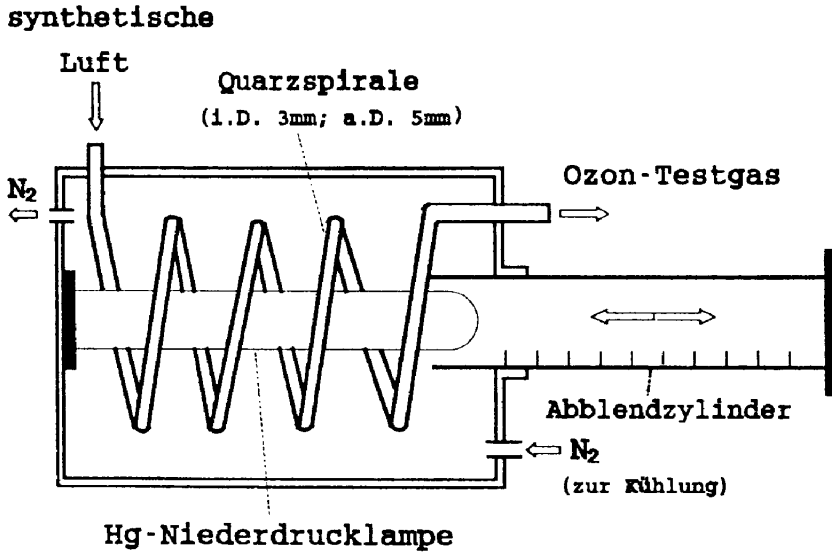

Abb. 42: Schematische Darstellung des Ozongenerators [62,150]

Er besteht aus einer Quarzspirale, die um eine abblendbare Hg-Niederdrucklampe angeordnet ist. Durch die Spirale wird synthetische Luft geführt. Durch die ultraviolette Strahlung wird Sauerstoff photolysiert, so daß aus O_2 und O Ozon gebildet werden kann. Die Ozonkonzentration im Testgas wird durch einen auf UV-Absorption basierenden Ozonanalysator gemessen. Die Kühlung der UV-Lampe erfolgte durch einen Stickstoffstrom (60 L/h), der durch das Generatorgehäuse geleitet wird. Die Ozonkonzentration kann durch eine über die UV-Lampe geschobene Blende sowie den Trägergas-Durchfluß variiert werden.

In Abb. 43 ist der Versuchsaufbau zur Untersuchung der Ozonstörung schematisch dargestellt.

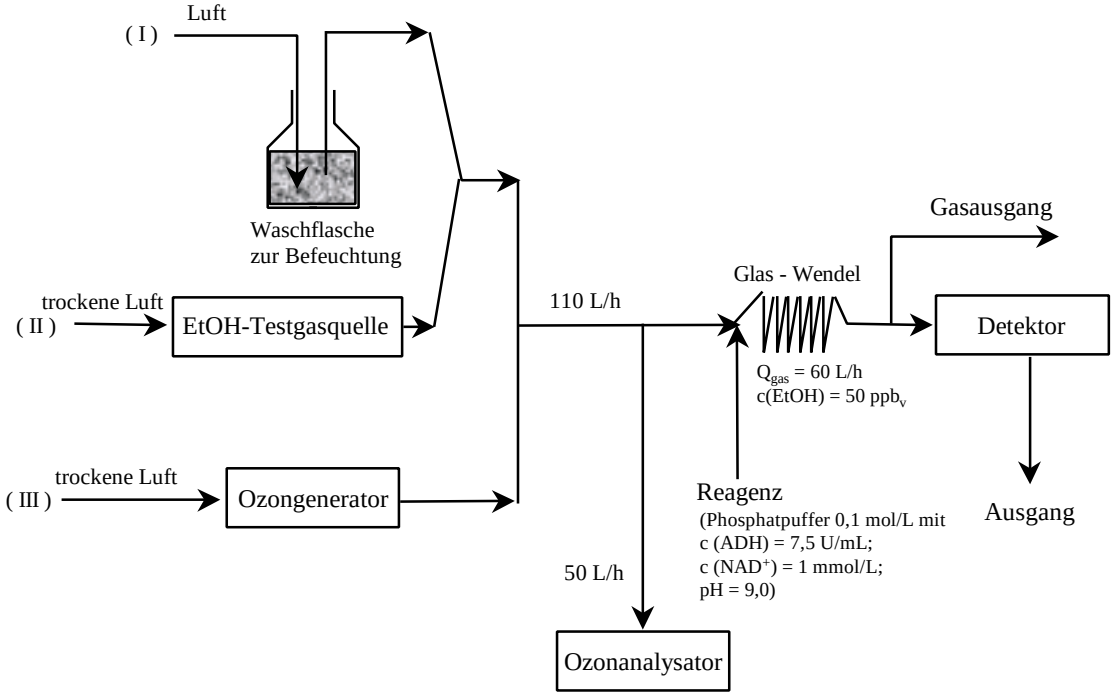

Abb. 43: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Ozonstörung

Die Gasflüsse I, II und III in Abbildung 43 wurden so eingestellt, daß der Gesamtgasfluß 110 L/h betrug, wovon 50 L/h durch den Ozonanalysator und 60 L/h durch die Glas-Wendel geleitet wurden. Die Konzentration an Ethanol im Gesamtgasstrom betrug konstant 50 ppb_v. Die Einstellung der unterschiedlichen relativen Feuchten erfolgte durch Variation der Verhältnisse des Flusses I zu den Flüssen II und III. Die relative Feuchte des Gesamtgasflusses wurde vor den jeweiligen Messungen experimentell mittels Feuchtefühler ermittelt. An dieser Stelle erfolgte auch die Messung der Ethanolkonzentration im Gas. Die Ozonkonzentration wurde unter Beibehaltung der jeweiligen Gasströmen durch Verschieben des Abblendzylinders im Ozonanalysator variiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 44 dargestellt.

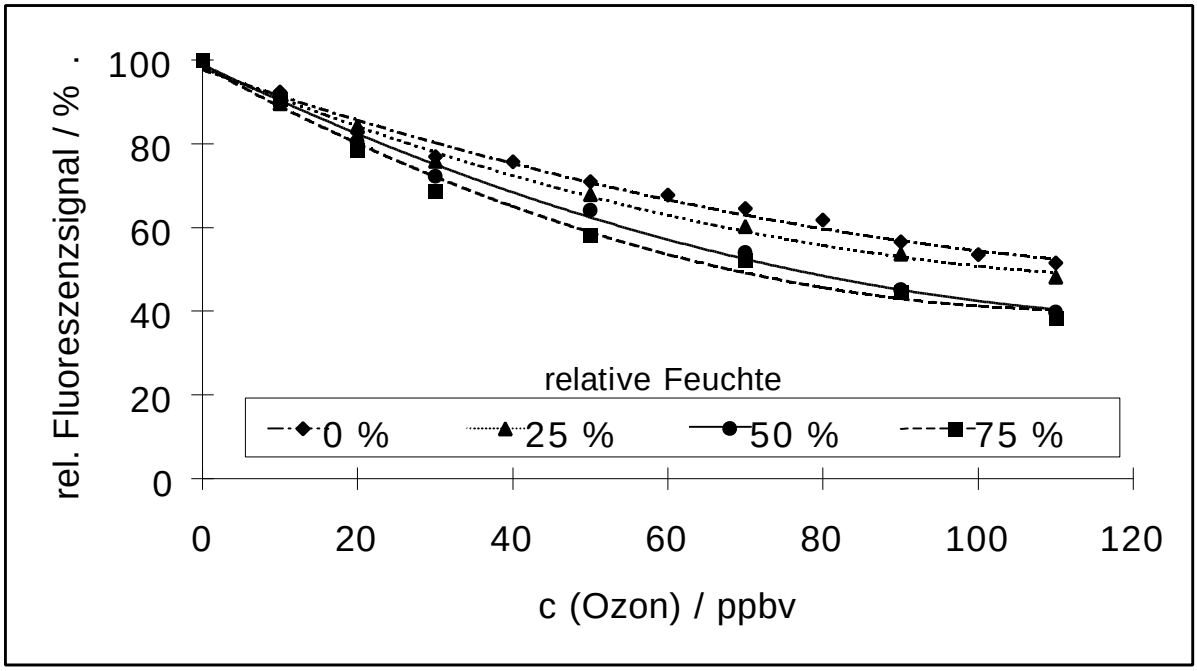

Abb. 44: Einfluß der Ozonkonzentration auf das Fluoreszenzsignal bei verschiedenen relativen Feuchten. Reagenzlösung (c(ADH) = 7,5 U/mL; c(NAD^+) = 1 mmol/L; pH = 9,0); $Q_{li;Ausg.(B)}$ = 150 µL/min; Q_{gas} (d. Wendel) = 60 L/h

Wie zu sehen, hat Ozon einen großen Einfluß auf die Ethanolbestimmung. So ist z. B. bei 20 ppb_v Ozon eine Reduzierung des Signals von 15-20 % zu beobachten, abhängig von der relativen Luftfeuchte. Eine Reduzierung von mehr als 50 % ist bei einer Ozonkonzentration von 100 ppb_v zu finden. Jüngste Untersuchungen [151] haben ergeben, daß Ozon hierbei einen Einfluß auf das Enzym ausübt.

Sind also während der Probenahme von Ethanol in Außenluft hohe Ozonkonzentrationen zu erwarten, muß das Ozon entfernt werden, ohne hierdurch die Gehalte von Ethanol meßbar zu beeinflussen. Zur Entfernung von Ozon sind mehrere Methoden bekannt:

1. Zersetzung des Ozons an katalytisch wirkenden Oberflächen [150]

2. Reaktion mit geeigneten Reagenzien, z.B. Kaliumiodid [152,153]

3. Gasphasentitration mit zudosiertem Stickstoffmonoxid [154]

Da die Gasphasentitration mit zudosiertem NO einen für Feldmessungen hohen apparativen Aufwand erfordert hätte, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur die ersten beiden Möglichkeiten untersucht. Dazu wurden eingesetzt:

1. ein mit MnO_2 beschichtetes Kupfernetz (Durchmesser 3,5 cm; Drahtstärke 11 µm; lichte Maschenweite 16 µm; Fa. Ansyco, Ettlingen)
2. ein mit KI beschichtetes Filter (Whatman No. 40; D = 3,7 cm)
3. ein innen mit KI beschichtetes Glasrohr (Denuder; I.D. 0,6 cm; A.D. 0,9 cm; l = 60 cm)

Diese Ozonfilter (Kupfernetz, bzw. mit KI beschichtetes Glasrohr oder Filter in einem entsprechenden Filterhalter) wurden jeweils direkt vor den Einlaß der Glas-Wendel geschaltet. Die Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgte bei verschiedenen Ozonkonzentrationen. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 aufgeführt.

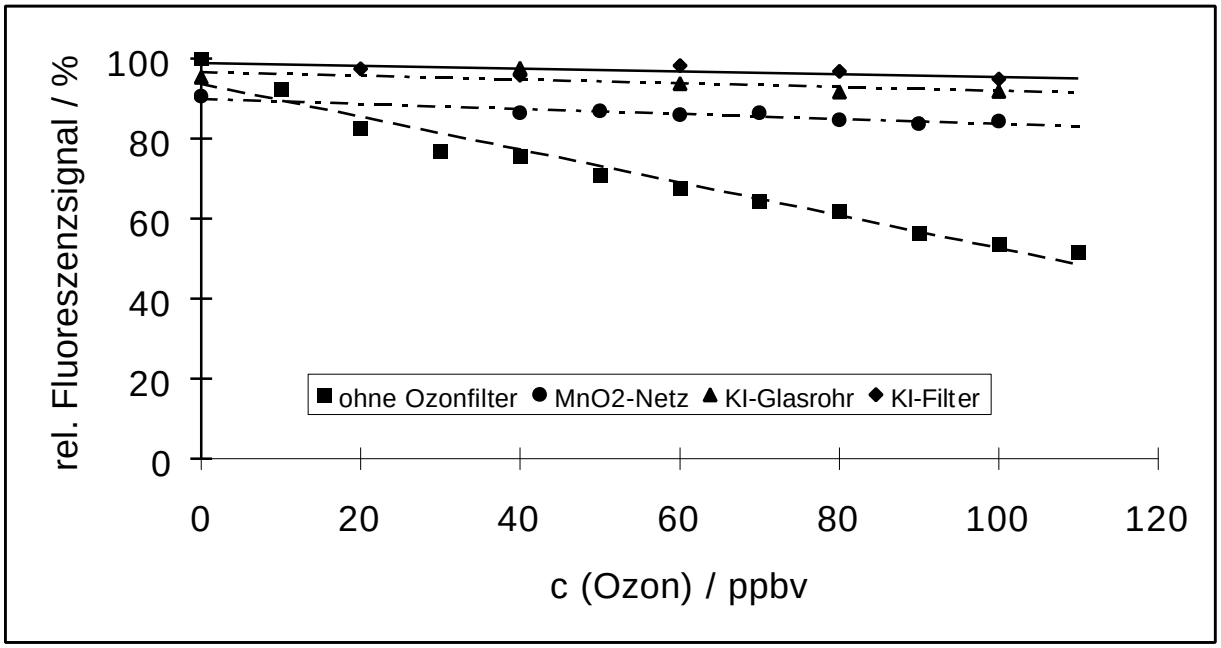

Abb.45: Einfluß der Ozonkonzentration auf das Fluoreszenzsignal bei Einsatz verschiedener Ozonfilter. Reagenzlösung (c(ADH) = 7,5 U/mL; c(NAD^+) = 1 mmol/L; pH = 9,0); $Q_{li;Ausg.(B)}$ = 150 µL/min; Q_{gas}(d. Wendel) = 60 L/h; rel. Feuchte ca. 0 %; das höchste Signal ist auf 100 % bezogen

Wie in der Abbildung zu erkennen, sind alle drei Vorfilter gut zur Eliminierung des Ozoneinflusses auf die Ethanolbestimmung geeignet. Unterschiedliches Verhalten ist dagegen hinsichtlich von Verlusten an Ethanol zu beobachten. Die größten Verluste von 12-14 % treten

beim mit MnO_2 beschichteten Kupfernetz auf. Das mit KI beschichtete Glasrohr zeigt ein um 5-6 % vermindertes Fluoreszenzsignal. Die geringsten Verluste mit ca. 3 % treten beim mit KI beschichteten Cellulose-Filter auf, das aus diesem Grunde für die weiteren Arbeiten als Vorfilter verwendet wurde.

3.4.3. Kalibrierung und Ansprechzeit für die kontinuierliche Ethanol-bestimmung in Außenluft

Die in ihrer bisherigen Entwicklung beschriebene Methode zur kontinuierlichen Bestimmung von Ethanol in Luft wurde mit Hilfe der Testgasquelle (Abb. 26) unter folgenden Bedingungen kalibriert:

Absorberlösung:	wässrige Lösung mit ADH (c = 7,5 U/mL) und NAD^+ (c = 1 mmol/L) in 0,1 molarem Phosphat-puffer (pH = 9,0)
Flußrate der Absorberlösung:	$Q_{Eing.(A)}$ = 230 µL/min $Q_{Ausg.(B)}$ = 150 µL/min
Flußrate des Ethanol-Testgases:	60 L/h
Ozonfilter:	ein mit KI beschichtetes Filter (Whatman No. 40, mit 100 µL gesättigter KI-Lsg belegt) wurde vor das Probenahmesystem geschaltet
Konzentration an Ethanol-Testgas:	0 - 112 ppb_v

Die unter diesen Bedingungen erzielte Kalibrationskurve ist in Abb. 46 gezeigt.

Das Fluoreszenzsignal wurde über einen Zeitraum von 1 h jeweils nach Verschieben des Stempels in der Testgasquelle (Abb. 26) aufgezeichnet.

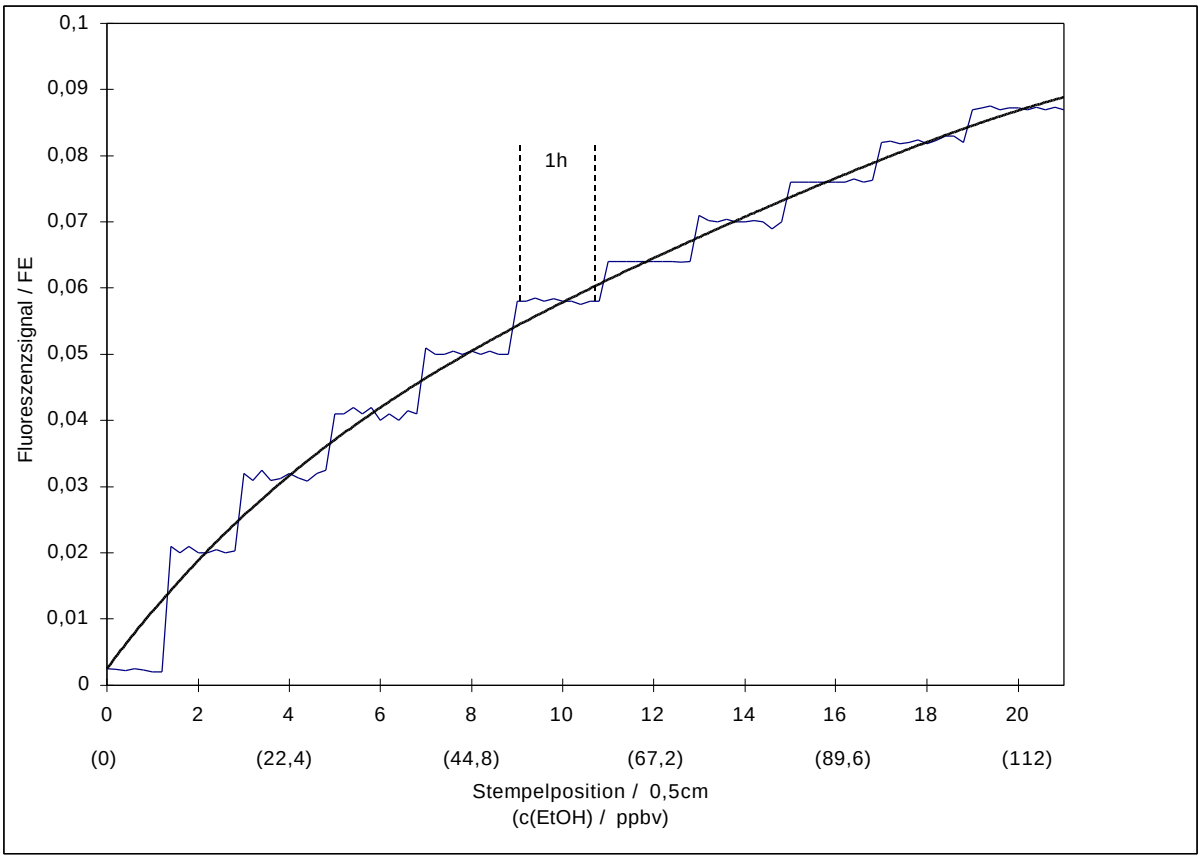

Abb. 46: Abhängigkeit der Fluoreszenzsignals von der Stempelposition. Position 0 bedeutet, daß die innere Oberfläche des Bereichs II der Testgasquelle (s. Abb. 27) gleich 0 und c(EtOH) = 0 ppb_v ist; Position 20: Bereich II = 10 cm und c(EtOH) = 112 ppb_v

Verbindet man die Mittelwerte der bei jeder Stempelposition erhaltenen Fluoreszenzsignale (Plateaus) miteinander, die jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde aufgenommen wurden, so ergibt sich der in Abb. 46 durch die breite Linie dargestellte nichtlineare Verlauf. Dieser ist typisch für enzymatische Reaktionen.

Für die Kurve ergeben sich folgende Parameter:

Nachweisgrenze NWG = 1 ppbv

Nach nichtlinearer Regresion:

Präzision s = 6,5 % (n = 5)
(c(EtOH) = 44 ppb_v)

$$c[ppb_v] = -1{,}48 + 580{,}25 \cdot [FE] + 3310{,}21 \cdot [FE]^2 + 61250{,}54 \cdot [FE]^3$$

$r^2 = 0{,}9998$

In Abb. 47 ist das Fluoreszenzsignal als Funktion der Zeit nach Verschieben des Stempels bei t = 0 min von Position 20 nach Position 0 und 6 min später von Position 0 nach Position 20 aufgetragen.

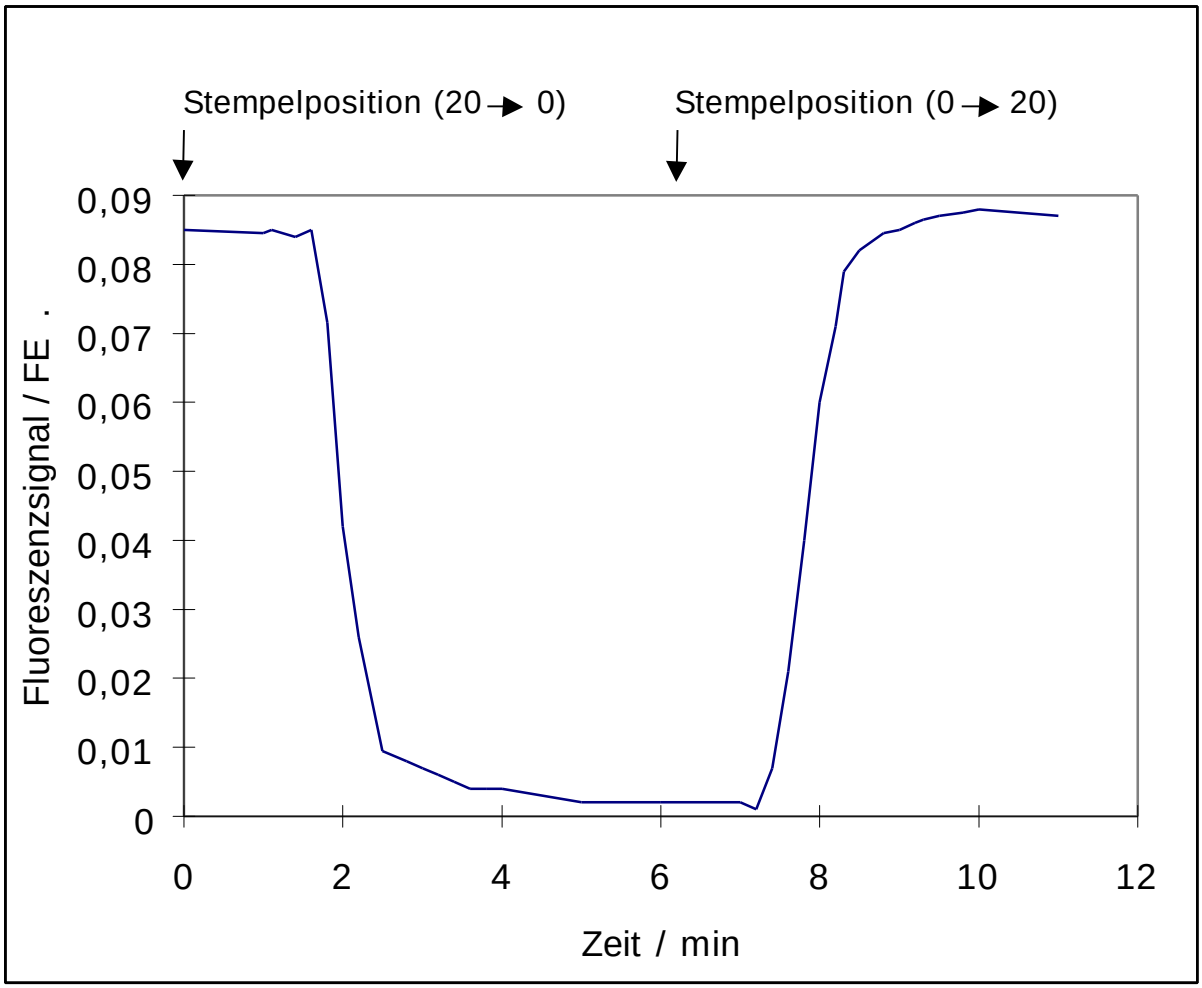

Abb. 47: Ansprechzeit des Ethanolmonitors. Position 0: c(EtOH) = 0 ppb_v; Position 20: c(EtOH) = 112 ppb_v

Aus der Signalkurve wurde für den Ethanolmonitor eine Ansprechzeit (Zeit, um 95 % des Endsignals zu erreichen) von 2,3 Minuten errechnet.

3.5. Experimentelles

3.5.1. Geräte und Materialien

Die folgenden Geräte und Materialien wurden zusätzlich zu den in Abschn. 2.5.1. aufgeführten benutzt.

- Meßgeräte zur Kontrolle des Volumenstromes:
- Mass Flow Meter Model FM-360 (Fa. Tylan Corp. Torrance, Ca)
- Mass Flow Controller FM-260 (Fa. Tylan Corp. Torrance, Ca)
- Mass Flow Controller FM-261 (Fa. Tylan Corp. Torrance, Ca)

- mit MnO_2 beschichtetes Kupfernetz (Durchmesser 3,5 cm; Drahtstärke 11 µm; lichte Maschenweite 16 µm) (Fa. Ansyco, Ettlingen)

- Netz-/Filterhalter aus PTFE (Eigenbau)

- Papierfilter Whatman (Grade No. 40; D = 3,7 cm)

- PTFE-Verbindungen für Glas-Wendel und KI-Denuder (Eigenbau)

- Duranglasrohr (I.D. 0,6 cm; A.D. 0,9 cm; l = 60 cm)

- Schwebekörperdurchflußmesser mit Feindosierventil (Fa. Rota Yokogawa, Wehr)

- Feuchtefühler, Typ Tastotherm-Hum RP 2 (Fa. Impac, Frankfurt)

- Ozongenerator als Ozon-Testgasquelle (Eigenbau)

- Ozonanalysator, Model 1008-Rs 515W (Fa. Dasibi, Environmental Corp., Colorado St., Glendale, Calif. (USA))

- Gasleitungen aus PTFE

- Thermostat MS Lauda (Fa. Lauda, Königshofen)

- Schlauchpumpe Ismatec IPC (Fa. Ismatec, Zürich)

- Tygonschläuche für die Schlauchpumpe (Tygon 3607 (Fa. Ismatec, Zürich))
  I.D. = 0,76 mm; Wanddicke = 0,8 mm
  I.D. = 0,44 mm; Wanddicke = 0,9 mm
  I.D. = 0,57 mm; Wanddicke = 0,85 mm

- Testgasquelle (Eigenbau)

- Silicon-/Polyethylenschlauch als Permeationsmembran (Fa. Ismatec, Zürich)

3.5.2. Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden zusätzlich zu den in Abschn. 2.5.2. aufgeführten benutzt.

- Kaliumiodid Merck 5043
- Aktivkohle; 35 - 50 mesh Merck 9631
- synthetische Luft zur Erzeugung von Ozon

3.5.3. Präparation der KI-Ozonfilter

a) Die innere Wand eines Glasrohres (Duranglas; I.D. = 0,6 cm; A.D. = 0,9 cm; l = 60 cm) wurde gleichmäßig mit Kaliumiodid beschichtet. Hierzu wurde 1 mL gesättigte KI-Lösung in das horizontal angeordnete Rohr gegeben und dieses unter Drehen in einem Stickstoffstrom von ca. 50 L/h getrocknet.

b) Zur Beschichtung eines Papierfilters (Whatman; Grade No. 40) wurden 100 µL gesättigte KI-Lösung gleichmäßig auf dem Filter verteilt. Die Trocknung erfolgte im Exsikkator.

4. Anwendung der beschriebenen Verfahren auf die Analyse von Außenluft

Die vorliegenden Verfahren zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft wurden in Zusammenarbeit mit der Bundesuniversität von Salvador/Bahia, Brasilien mit dem Ziel entwickelt, Konzentrationen der Alkohole in der bodennahen, belasteten Atmosphäre zu messen. Die vorbereitenden Laborarbeiten waren Anfang 1996 abgeschlossen, so daß die Leistungsfähigkeit der Verfahren für die Bestimmung von Alkoholen in Außenluft im Zeitraum April/Mai 1996 in Brasilien getestet werden konnte. Als Meßstandorte wurden die Innenstadt von São Paulo und Cubatão, eine stark industrialisierte Region an der Atlantikküste des Staates São Paulo, ausgewählt.

São Paulo, Hauptstadt des brasilianischen Bundesstaates São Paulo und mit 15-20 Millionen Einwohnern die größte Stadt Brasiliens, liegt in 820 m Höhe über dem Meersspiegel [155]. Die großen Probleme mit der Luftverschmutzung sind zum größten Teil auf Schwer-, Chemie- und Textilindustrie sowie auf Emissionen von ca. 6 Millionen Kraftfahrzeugen zurückzuführen.

Die Stadt Cubatão liegt 45 km südöstlich von São Paulo in unmittelbarer Nähe der Atlantikküste, am Fuße einer ca. 1000 Meter hohen Bergkette, der Serra do Mar, die sich von Südwesten nach Nordosten erstreckt. In direkter Umgebung sind chemische Industrie, Petrochemie und Düngemittelindustrie auf einem Gebiet von etwa 40 km^2 konzentriert [156]. Die besonderen orographischen Verhältnisse bringen es mit sich, daß sich die von den zahlreichen Fabriken emittierten Schadstoffe wie in einem Kessel ansammeln können. Man findet in der Regel bei überwiegend lokal beeinflußtem Wetter tagsüber (ab ca. 10 Uhr) Seewind und abends sowie nachts Landwinde.

In Abb. 48 ist ein Kartenausschnitt mit der Umgebung von Cubatão gezeigt[156].

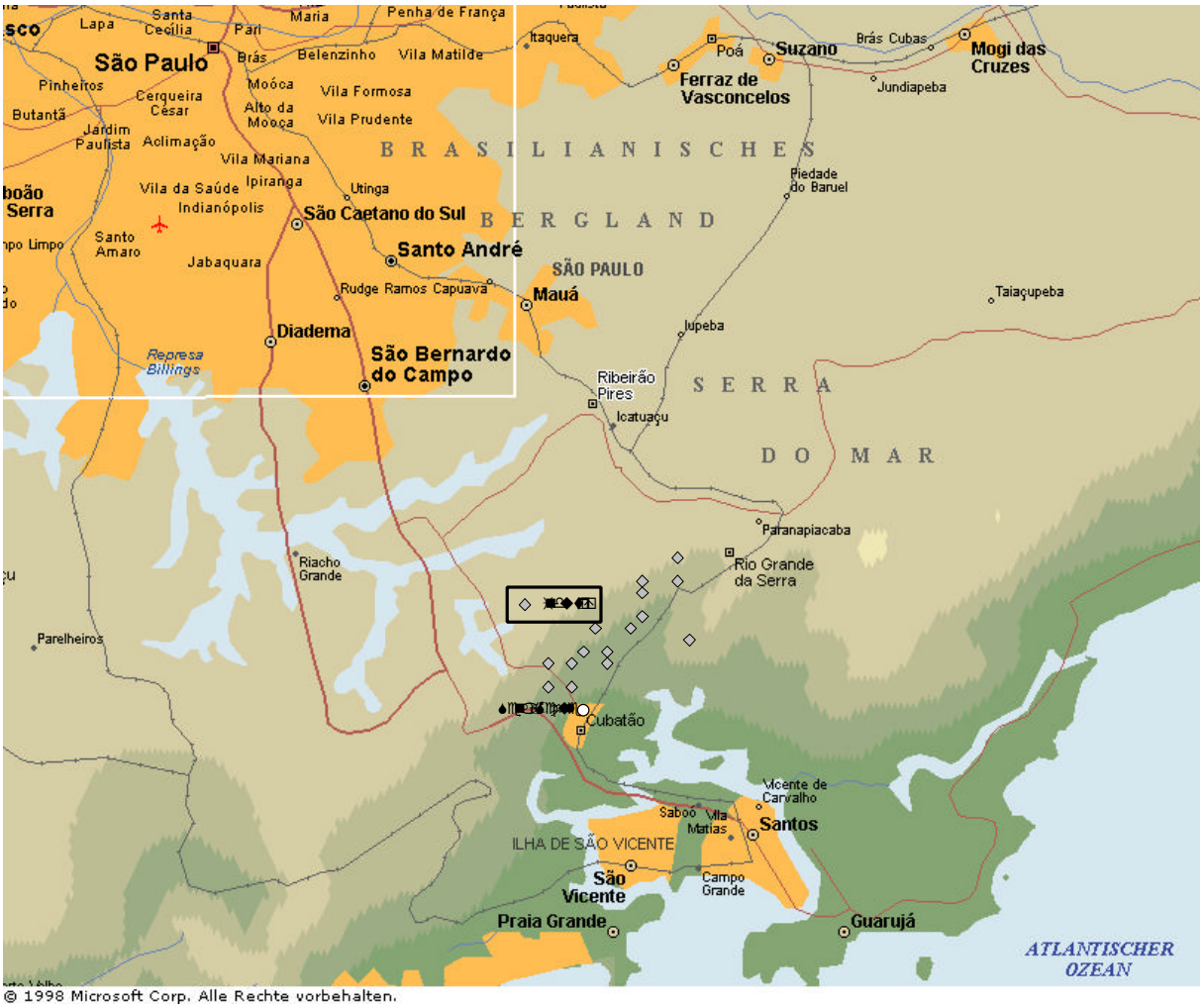

Abb. 48: Die geographische Lage von Cubatão [156]

Im Untersuchungsgebiet wird der größte Teil der Fahrzeuge mit ca 90 %igem Ethanol bzw. einem Gemisch aus Benzin, Methanol und Ethanol betrieben [9].

Während der erwähnten Meßkampagne wurde sowohl die diskontinuierliche Probenahme-und Analysenmethode zur Bestimmung von Methanol und Ethanol, als auch das kontinuierlich arbeitende Verfahren zur Bestimmung von Ethanol in Luft eingesetzt.

Das kontinuierlich arbeitende Verfahren befand sich stationär in der Senai-Schule im Zentrum von Cubatão, auf deren Gelände vom 03.05.1996 bis zum 23.05.1996 Ethanolmessungen durchgeführt wurden. Die diskontinuierliche Probenahme erfolgte in Cubatão und in der

näheren Umgebung der Stadt. Zusätzlich bot sich die Möglichkeit, während eines Fluges über der Region von Cubatão Messungen durchzuführen.

Messungen in Cubatão und São Paulo/Brasilien

Um das diskontinuierliche Bestimmungsverfahren – Probenahme mit Glas-Wendel, HPLC mit Nachsäulenderivatisierung - mit dem kontinuierlich arbeitenden vergleichen zu können, erfolgten mit beiden Verfahren an verschiedenen Tagen parallele Probenahmen an der Senai-Schule in Cubatão. Die Probenahmezeiten für die diskontinuierlichen Bestimmungen variierten zwischen 10 und 40 Minuten. Ein Vergleich beider Meßmethoden gelang durch Integration der kontinuierlich aufgenommenen Meßwerte über die entsprechende Probenahmezeit bei der diskontinuierlichen Methode.

Abb. 49 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleichs.

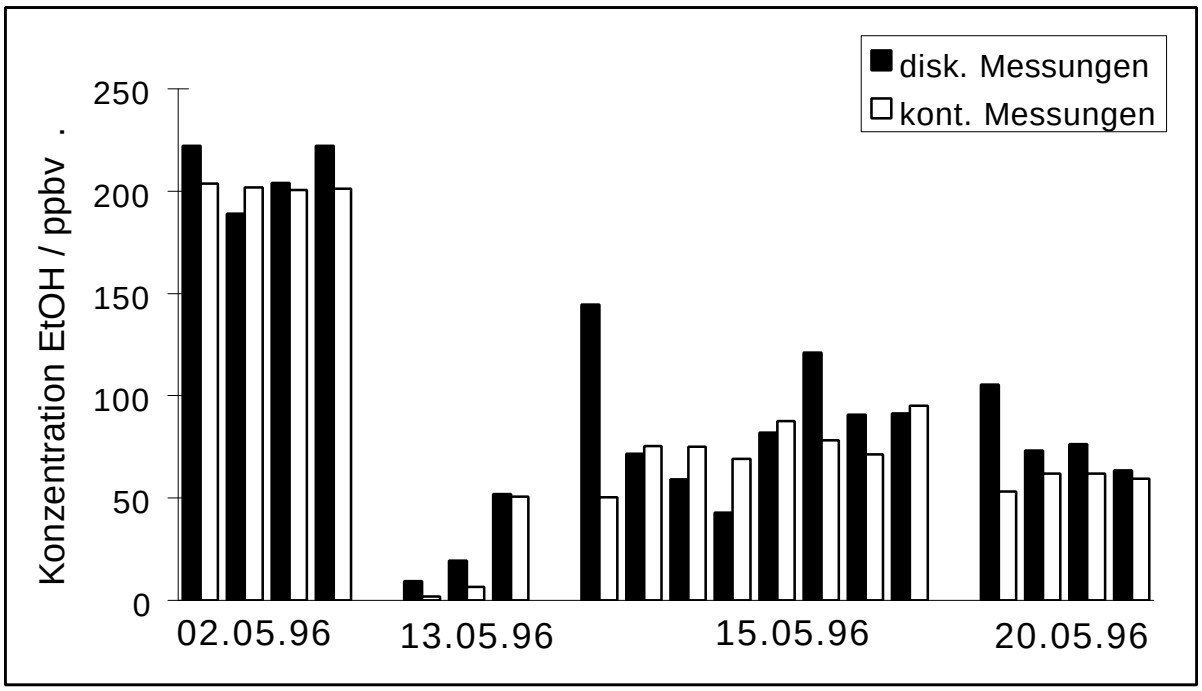

Abb. 49: Vergleich der Ergebnisse der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Messungen

Es ist zu erkennen, daß bis auf wenige Ausnahmen beide Verfahren im Konzentrationsbereich bis 250 ppb_v Ethanol recht gut übereinstimmende Werte liefern.

Ziel der Feldmessungen war es, einen ersten Eindruck über Konzentrationsvariationen der luftgetragenen Alkohole in Emittentennähe (Straßen) und im Tagesverlauf zu erhalten.

Die Resultate dieser Messungen sind den Abbildungen 50-52 zu entnehmen. Die ermittelten Konzentrationen an Ethanol liegen durchgehend höher als die von Methanol.

Abbildung 50 zeigt die Ergebnisse von Messungen in Cubatão, am 14. und 17. Mai 1996.

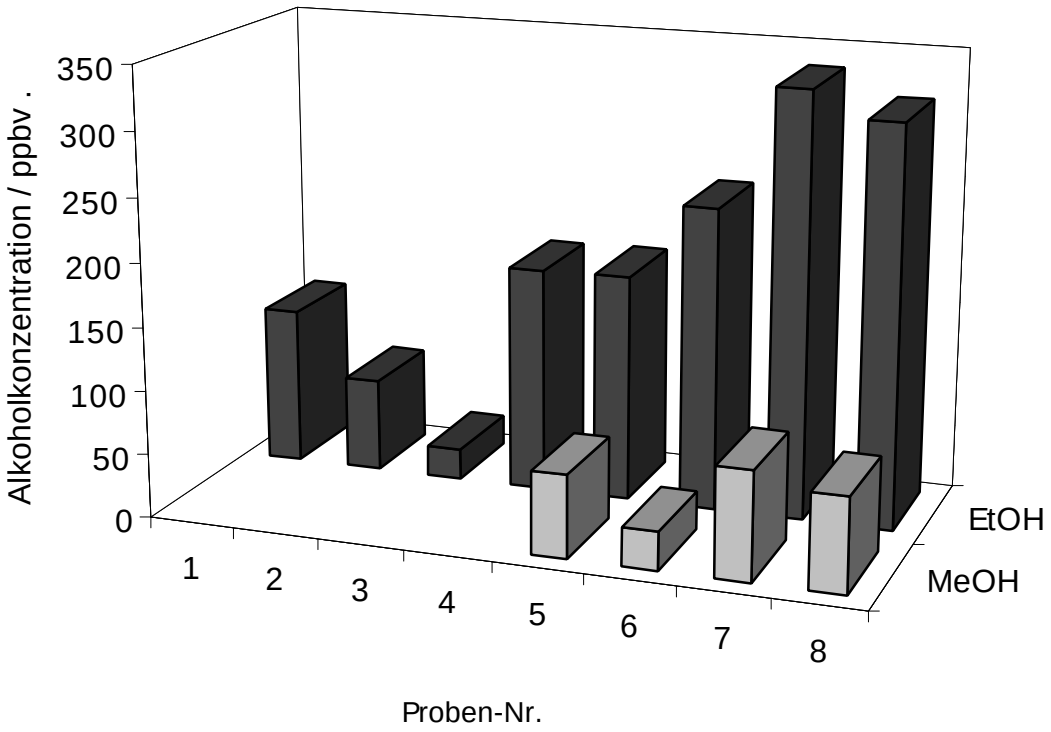

Abb. 50: Konzentrationen von Alkoholen in Luft in Cubatão am 14. und 17. Mai 1996

Proben 1-2:	Hauptstraße Cubatão; 14.05.1996 (15:40-16:20)
Probe 3:	Praça da Biblia; 14.05.1996 (16:30-16:50)
Proben 4-8:	Hauptstraße Cubatão; 17.05.1996 (15:36-16:59)

Zahlen zum Verkehrsaufkommen an beiden Meßtagen konnten nur grob geschätzt werden, die höchsten Konzentrationen (350 ppb_v Ethanol; 100 ppb_v Methanol) wurden jedoch während der Zeit mit der höchsten Verkehrsdichte gefunden.

In Abb. 51 sind die Ergebnisse von Messungen dargestellt, die in der näheren Umgebung von Cubatão durchgeführt wurden.

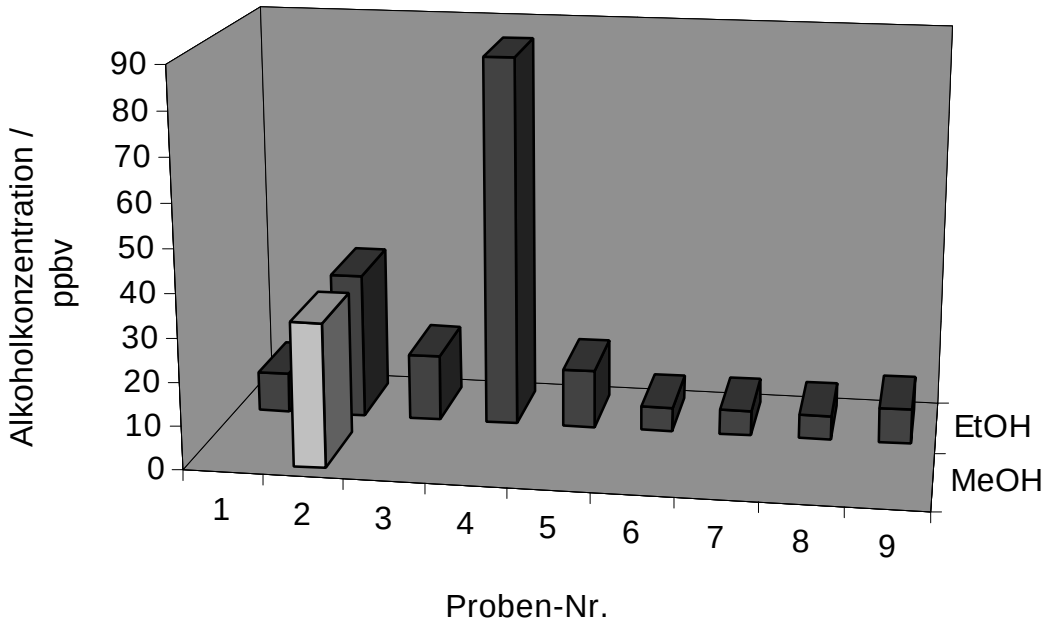

Abb. 51: Konzentrationen von Alkoholen in Luft in der Umgebung von Cubatão und in Barragem das Pedras

Proben 1-3:	Via dos Imigrantes; 18.05.1996 (15:25-16:15)
Probe 4:	Via Anchieta; 18.05.1996 (16:37-16:52)
Proben 5-6:	Barragem das Pedras (Serra do Mar); 22.05.1996 (15:45-15:18); ca. 800 m über N.N.
Proben 7-8:	Rancho da Maioridade (Serra do Mar); 22.05.1996 (15:40-16:14); ca. 500 m über N.N.
Probe 9:	Cubatão/Nähe Petrobras; 22.05.1996 (17:01-17:15); ca. 20 m über N.N.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Konzentrationsbereiche hier weit unterhalb derer liegen, die im Innenstadtbereich von Cubatão gefunden wurden. Die höchsten Meßwerte wurden in der Nähe der Schnellstraßen Via dos Imigrantes und Via Anchieta gefunden. Relativ geringe Konzentrationen (< 15 ppb_v Ethanol) wurden an Standorten in der Serra do Mar-Region gemessen, die abseits viel befahrener Straßen liegen. Eine Höhenabhängigkeit der Ergebnisse konnte hierbei nicht festgestellt werden.

In der Innenstadt und der näheren Umgebung von São Paulo wurden am 21. Mai 1996 Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 52 zu sehen sind. An verschiedenen Standorten im Stadtgebiet von São Paulo ließen sich Alkoholkonzentrationen in Außenluft messen, die deutlich mit der Verkehrsdichte korrelierten.

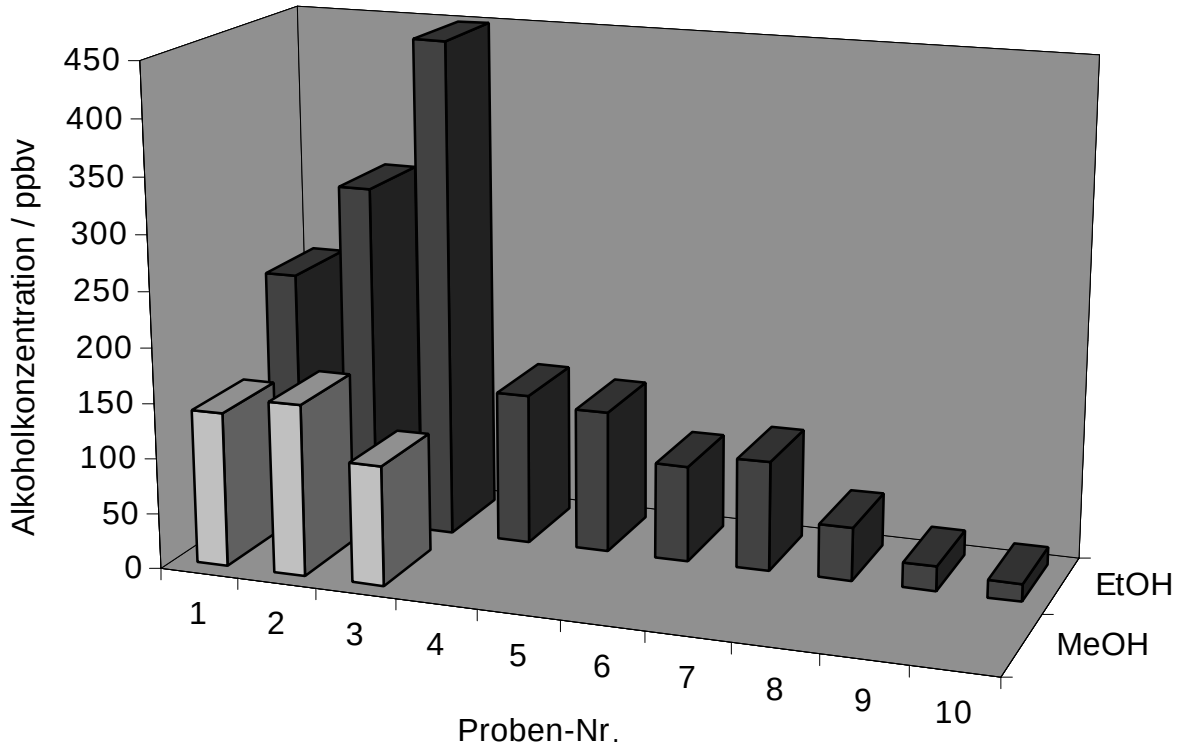

Abb. 52: Konzentrationen von Alkoholen in Luft am 21.05.1996 in São Paulo und seiner näheren Umgebung

Proben 1-3:	São Paulo/Avenida Paulista; 21.05.1996 (11:52-12:32)
Proben 4-7:	São Paulo/Universität; 21.05.1996 (14:01-14:51)
Proben 8-10:	Imigrantes/Dersa Station; 21.05.1996 (14:55-16:48)

Die höchsten Alkoholkonzentrationen wurden mit bis zu 450 ppb_v für Ethanol und 150 ppb_v für Methanol in der Avenida Paulista, einer Straße mit dichter, hoher Bebauung und sehr hohem Verkehrsaufkommen, gemessen. In der Nähe der Universität von São Paulo, mit geringerem Verkehrsaufkommen als in der Avenida Paulista, lagen die Ethanolkonzentrationen zwischen 99 und 136 ppb_v. An der Dersa Station am Stadtrand von São Paulo waren nur noch Ethanolkonzentrationen zwischen 15 und 49 ppb_v zu finden.

Am 07. Mai 1996 ergab sich die Möglichkeit, Proben während eines Meßfluges zu nehmen. Hiermit sollte ein Eindruck über Höhengradienten gewonnen werden. Die Probenahme erfolgte in unterschiedlichen Höhen über der Serra do Mar, Cubatão und dem Meer, an einem sonnigen Tag mit überwiegend Landwind.

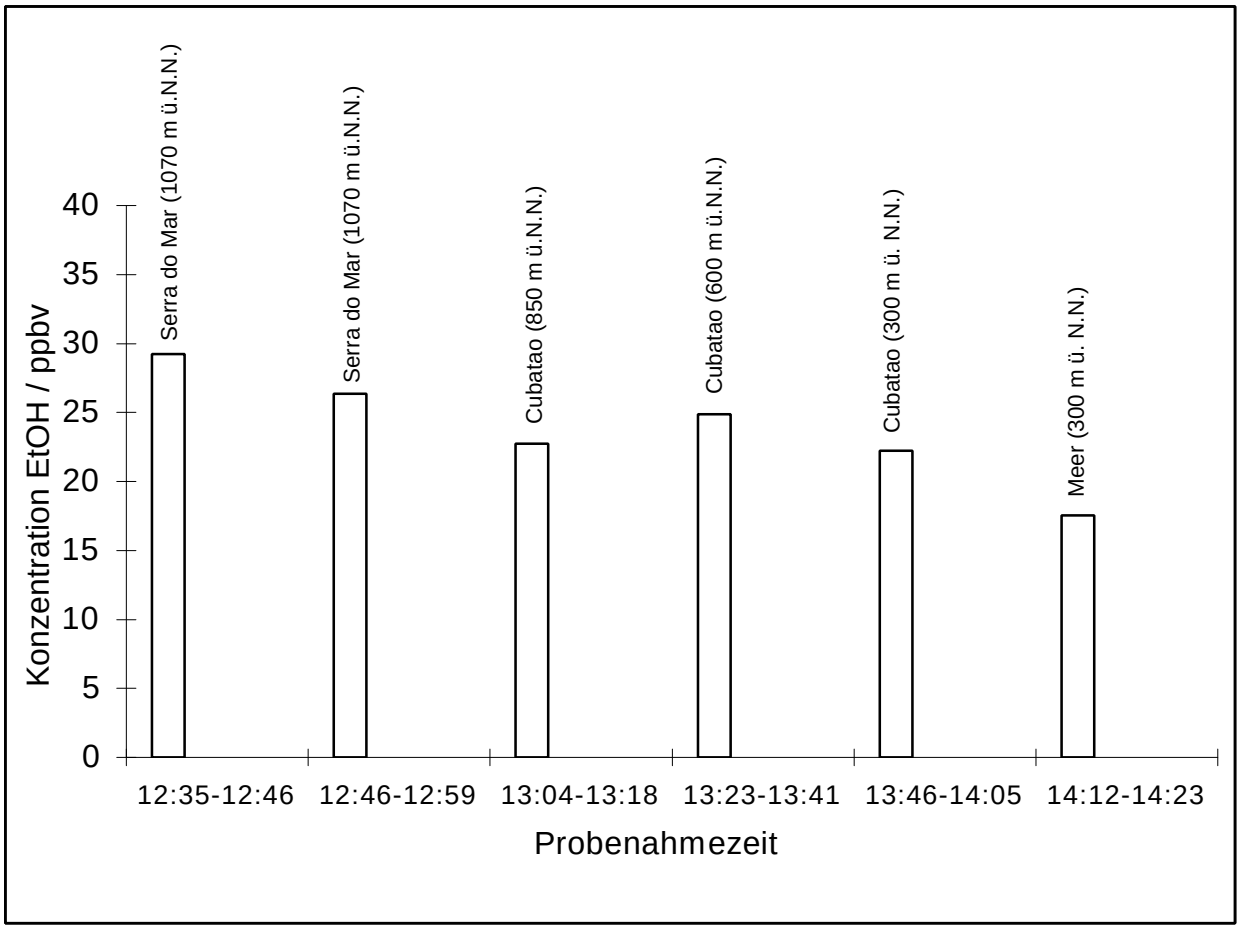

Abb. 53: Konzentrationen an Ethanol in Luft am 7.05.1996 während eines Fluges über Cubatão und Umgebung

Wie aus Abb. 53 hervorgeht, wurden bei diesen Messungen Ethanolkonzentrationen im Bereich von 17 bis 30 ppb_v gefunden. Der Trend hinsichtlich der Konzentrationen in den verschiedenen Höhen ist nur gering ausgeprägt. Selbst über dem Meer, von Emissionsquellen entfernt, konnte noch eine relativ hohe Ethanolkonzentration von 17 ppb_v gefunden werden. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich in einem Abweichen der Windrichtung an diesem Tag vom normalen Land-Seewindzyklus. Der Wind war auch während der Tagstunden ständig vom Land zum Meer gerichtet. Daher konnten Luftmassen von São Paulo aus, welches eine große Alkoholemissionsquelle darstellt, relativ schnell über die Serra do Mar-Region in Richtung Meer transportiert werden.

Die kontinuierlich arbeitende Meßapparatur befand sich aufgrund des notwendigen Netzanschlusses stationär in der Senai-Schule in Cubatão. Hierdurch bot sich durch Messung über längere Zeiträume an einem Ort die Möglichkeit, Aussagen über die Variation der Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von Wochentagen und Tageszeiten zu machen. Diese Messungen wurden mit einigen Unterbrechungen im Zeitraum vom 03.05.1996 bis 23.05.1996 durchgeführt.

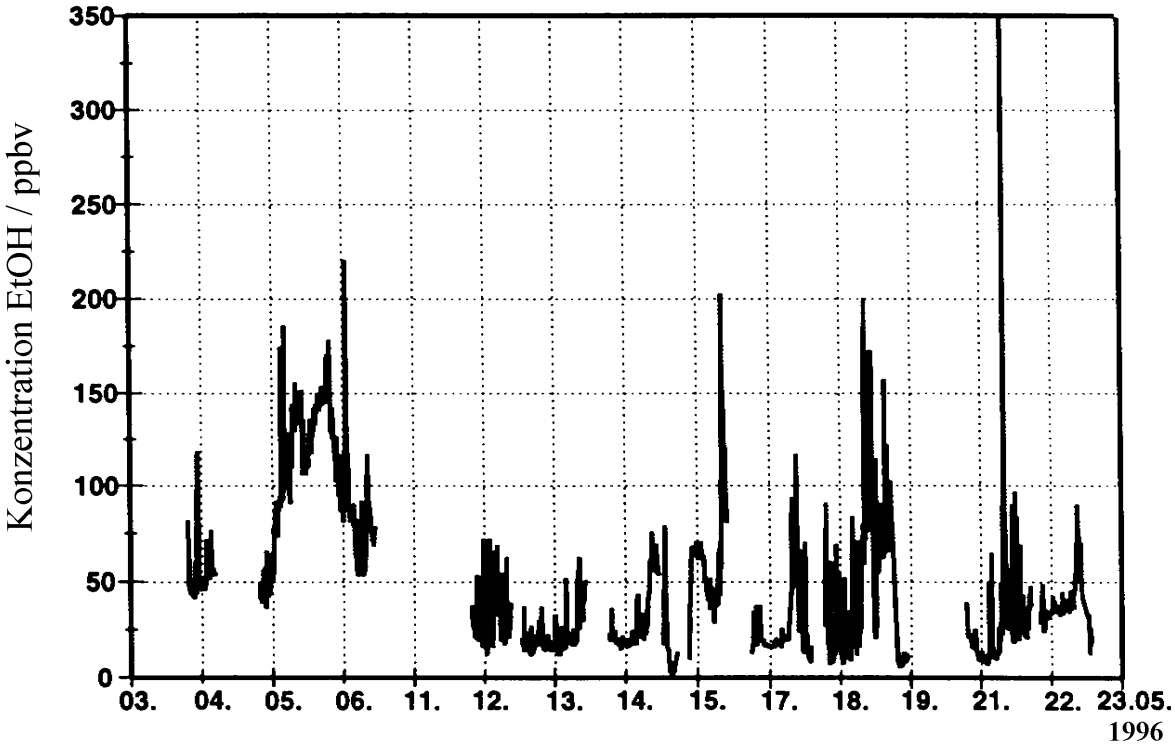

Abb. 54: Konzentrationen an Ethanol in Luft, gemessen mit der kontinuierlich arbeitenden Methode; 03.05. - 23.05.1996; Senai-Schule; Cubatão

Aus der Abb. 54 ist zu erkennen, daß die Konzentrationen an Ethanol in Luft sehr stark mit der Zeit variieren. Die höchste gemessene Konzentration an Ethanol betrug 350 ppb_v.

Da für die Meßperiode meteorologische Parameter, wie insbesondere Windrichtung und Windgeschwindigkeit, nicht vorlagen, war die Interpretation der Daten schwierig. Wenn allerdings die Verkehrsdichte im Zusammenhang mit der Ethanolkonzentration steht, müßte eine Auswertung der Daten hinsichtlich der Tageszeit eine gewisse Struktur erkennen lassen.

Um zu diesbezüglichen Aussagen zu gelangen, wurden die in Abbildung 54 gezeigten kontinuierlichen Meßwerte in Intervallen von je einer Stunde gemittelt und die zu einer bestimmten Uhrzeit gehörenden Mittelwerte gegen eben diese Uhrzeit aufgetragen.

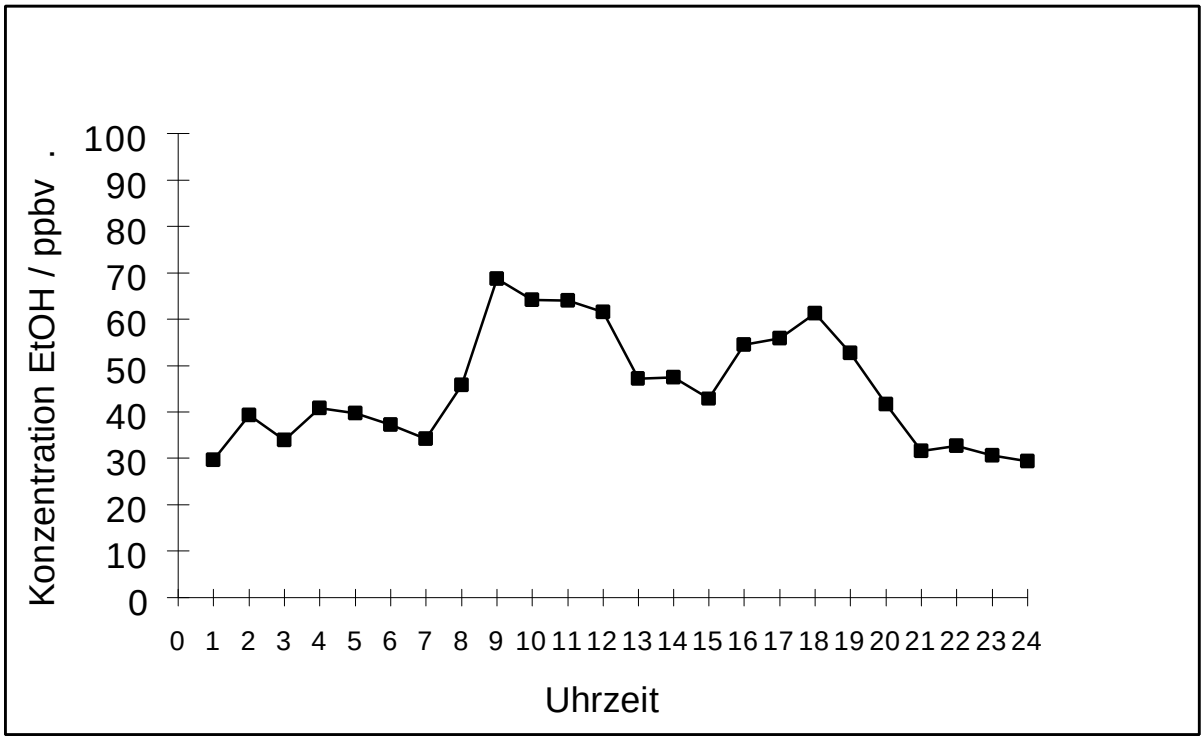

Abb. 55: Tagesgang der Ethanolkonzentrationen; 03.05.-23.05.1996; Senai-Schule; Cubatão

Der in Abbildung 55 dargestellte Tagesgang zeigt eine typische bimodale Verteilung mit Konzentrationsspitzen bis zu 70 ppb_v, die mit Verkehrsmaxima am Vormittag und Nachmittag korrelieren. Insgesamt ist mit einer Ethanolkonzentration von 30 bis 40 ppb_v auch nachts, bei geringem Verkehrsaufkommen, ein recht hohes permanentes Konzentrationsniveau vorhanden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Luft entwickelt. Im ersten Teil der Arbeit wurden Verfahren untersucht, mit denen sich Methanol und Ethanol in wässrigen Medien bestimmen lassen.

Zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in wässrigen Proben nebeneinander wurden diese nach chromatographischer Trennung mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase oxidiert. Das bei der Reaktion entstehende Reaktionsprodukt H_2O_2 konnte entweder chemiluminometrisch nach Reaktion mit Luminol oder fluorimetrisch nach Umsetzung mit p-Hydroxyphenylessigsäure und Peroxidase empfindlich bestimmt werden. Die Bestimmung von Ethanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase und des Coenzyms NAD^+ konnte aufgrund der hohen Selektivität des Enzyms ohne chromatographische Trennung erfolgen. Die Detektion des gebildeten NADHs war direkt durch UV-Photometrie bzw. Fluorimetrie möglich.

Nach Optimierung der Bestimmungsmethoden für Alkohole in wässrigen Medien erfolgte die Entwicklung von Probenahmemethoden zur Anreicherung von Methanol und Ethanol aus Luft. Hierzu wurde zuerst eine Testgasquelle aufgebaut, die nach dem Permeationsprinzip arbeitet. Bei dieser Testgasquelle können Änderungen der Testgaskonzentrationen schnell und ohne Änderung der äußeren Parameter eingestellt werden. Hiermit konnten gasförmige Methanol- und Ethanolkonzentrationen reproduzierbar und zuverlässig im ppb_v-ppm_v-Bereich hergestellt werden. Der Gesamtausstoß aus der Quelle wurde in Abhängigkeit vom Membranmaterial und der Konzentration der wässrigen Alkohollösung untersucht.

Mit dieser Testgasquelle ließ sich eine Methode zur Sammlung und Anreicherung von Alkoholen aus Luft entwickeln. Durch eine Absorber-Wendel aus Glas kommen Luft und Absorberlösung in engen Kontakt. Die Absorberlösung bildet an der inneren Glasoberfläche einen Film aus, der eine große Oberfläche für den Gasaustausch bietet. In einem vertikalen Glasrohr am Ende der Wendel erfolgt eine Trennung von Gas und Flüssigkeit. Die Flüssigkeitsproben werden gesammelt und analysiert. Das Probenahmesystem wurde zur Anreicherung von Methanol und Ethanol aus Luft optimiert. Hierzu erfolgte die Untersuchung

des Einflusses von Gas- und Lösungsdurchfluß durch die Wendel und von der Temperatur auf die Sammeleffizienz.

Nach diesen Arbeiten konnte ein Analysensystem für Feldmessungen aufgebaut werden. Hiermit ließen sich nach chromatographischer Trennung der Alkohole und enzymatischer Bestimmung mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase Nachweisgrenzen von 6,03 ppb_v für Methanol und 21,10 ppb_v für Ethanol erzielen. Mit der enzymatischen Umsetzung mit Hilfe des Enzyms Alkoholdehydrogenase und des Coenzyms NAD^+ ließ sich eine Nachweisgrenze von 3,93 ppb_v für Ethanol erreichen.

Durch Verbindung der Glas-Wendel mit einem Fluoreszenzdetektor ließ sich ein kontinuierliches Verfahren zur selektiven Bestimmung von Ethanol in Außenluft entwickeln. Die Absorberlösung enthielt die Reagenzien ADH und NAD^+, so daß während der Probenahme Ethanol direkt zu NADH reagieren konnte. Dieses wurde on-line fluorimetrisch bestimmt. Durch Positionierung eines mit Kaliumiodid beschichteten Filters vor dem Gas-Eingang zur Glas-Wendel konnten Störungen des Bestimmungsverfahrens durch Ozon eliminiert werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag bei 2,38 ppb_v.

Die entwickelten Probenahmesysteme wurden während einer Meßkampagne im April/Mai 1996 in São Paulo und Cubatão/ Brasilien zur Bestimmung von Methanol und Ethanol in Außenluft eingesetzt. In Abhängigkeit von Standorten, von meteorologischen Parametern und vom Verkehrsaufkommen konnten Konzentrationen an Methanol bis zu 150 ppb_v und an Ethanol bis zu 450 ppb_v gemessen werden. Es konnte gezeigt werden, daß die entwickelten Verfahren zur Bestimmung der Alkohole in anthropogen belasteter Außenluft gut geeignet sind.

6. Literaturverzeichnis

[1] J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.); *Römpp Chemie Lexikon*, 10. Auflage, Band 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1996, S. 1243,1245,1246,1493

[2] Ullmann´s Encyclopedia of Industrial Chemistry; 5 Aufl., Vol. A 16, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1985, 465

[3] H. Menrad, A. König; *Alkoholkraftstoffe*. Springer-Verlag, Wien 1982

[4] K. Grießbaum, D. Hönicke; *Kraftstoffe der Zukunft*. Chemie in unserer Zeit 3 (1980) 90-101

[5] H.-D. Hill; *Benzin aus Pflanzen - Vom Ölfeld zur Energiefarm*. Nobel-Verlag GmbH, Essen 1982

[6] D. Osteroth; *Von der Kohle zur Biomasse*. Springer-Verlag, Berlin 1989

[7] M. Zabel; *Analyse und Bewertung der Ethanolherstellung aus Biomasse - Kosten und Schadstoffemissionen. Dargestellt am Beispiel des Bundesstaates Sao Paulo, Brasilien*. Dissertation, Universität Berlin, 1994

[8] J. Schulz; *Analysis of oxygenated compounds in motor gasoline by HR GC-FTIR-MS*. J. Anal. Chem. 333 (1989) 759-760

[9] CETESB; *The air we breath*. Environmental Sanitation Agency 1990, 12-13

[10] A. Szwarc, G. M. Branco; *Automotive emissions - The brazilian control program*. CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1994, 17-27

[11] S. Lowry, R. S. Devoto; *Exhaust emissions from a single-cylinder engine fueled with gasoline, methanol and ethanol*. Com. Sci. Tech. 12 (1976) 177-182

[12] C. L. Gray jr., J. A. Alson; *Ein Plädoyer für das Methanol-Auto*. Spektrum der Wissenschaft (1990) 74-81

[13] R. Snow, L. Baker, W. Crews, C. O. Davis, J. Duncan, N. Perry, P. Siudak, F. Stump, W. Ray, J. Braddock; *Characterization of emissions from a methanol fueled motor vehicle*. JAPCA 39 (1989) 48-54

[14] V. A. Isidorov; *Organic Chemistry of the earth´s atmosphere.* Springer-Verlag, Berlin 1990

[15] E. Lahman, B. Seifert, W. Dulson; Bundesgesundheitsblatt 21 (1978) 75

[16] H. B. Singh, M. Kanakidou, P. J. Crutzen, D. J. Jakob; *High concentrations and photochemical fate of oxygenated hydrocarbons in the global troposphere*. Nature 378 (1995) 50-54

[17] J. R. Snider, G.A. Dawson; *Tropospheric light alcohols, carbonyls and acetonitrile: concentrations in the southwestern united states and henry`s law data*. J. geophys. Research 90(1985) 3797-3805

[18] E. Leibrock, J. Slemr; *Method for measurement of volatile oxygenated hydrocarbons in ambient air*. 20 (1997) 3329-3339

[19] R. C. Mac Donald, R. Fall; *Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere*. Atm. Env. 27A (1993) 1709-1713

[20] P. Fabian; *Atmosphäre und Umwelt.* Springer-Verlag, Berlin 1992, 4. Auflage

[21] T. E. Graedel, J. P. Crutzen; *Chemie der Atmosphäre*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1994

[22] R. Atkinson; *Gas-phase tropospheric chemistry of organic compounds*: *a review.* Atm. Env. 24 (1990) 1-41

[23] P. J. Crutzen; *Average concentrations of OH in the troposphere, and the budgets of* CH_4, *CO,* H_2 *and* CH_3CCl_3. Geophys. Research Letters 4 (1977) 321-324

[24] P. Carlier, H. Hannachi, G. Mouvier; *The chemistry of carbonyl compounds in the atmosphere - a review.* Atm. Env. 20 (1986) 2079-2099

[25] R. Overend, G. Paraskevopoulos; *Rates of OH radical reactions. Reactions with methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol at 296 K*. J. Phys. Chem. 82 (1978) 1329-1333

[26] O. C. Zafiriou; *Reaction of methyl halides with seawater and marine aerosols*. Mar. Res. 33 (1975) 75-81

[27] P. L. Hanst, B. W. Gray jr.; *Photochemical reactions among formaldehyde, chlorine and nitrogen dioxide in air*. Env. Sci. Techn. 11 (1977) 1105-1109

[28] E.-P. Röth; *Ozonloch-Ozonsmog*: *Grundlagen der Ozonchemie*. Meyers Forum, B. I. Taschenbuchverlag, Leipzig 1994

[29] G. D. Haymann, T. P. Murrells, M. E. Jenkin; *Kinetics of reactions of organic peroxy radicals produced in the oxidation of propionaldehyde*. Air Pollution Research 33 (1999) 76-80

[30] Y. Akutsu, F. Toyoda, K.-J. Tomita, M. Tamura, T. Yoshida; *Effect of exhaust from alcohol fuels on ozone formation in the atmosphere.* Atm. Env. 25 (1991) 1383-1389

[31] M. Whitbeck; *Photo-oxidation of methanol*. Atm. Env. 17 (1983) 121-126

[32] R. L. Tanner; *Atmospheric chemistry of aldehydes: Enhanced peroxyacetyl nitrate formation from ethanol-fueled vehicular emissions*. Environ. Sci. Technol. 22 (1988) 1026-1034

[33] E. Keppler; *Die Luft, in der wir leben*. R. Piper GmbH & Co. KG, München 1988

[34] G. Fellenberg; *Chemie der Umweltbelastung*. Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart 1992

[35] Dräger; *Boden-, Wasser- und Luftuntersuchungen*. Drägerwerk AG Lübeck 1991

[36] Dräger; Tragbare Warnung vor Gasgefahren. Sonderdruck Dräger-Werk AG, Moislinger Allee 53-55, Lübeck

[37] R. Bernt; *Mikroprozessorgesteuerte Sensoren für brennbare Gase und Schwefelwasserstoff*. Techn. Messen 54 (1987) 437-438

[38] R. Bernt; *Gassensoren für brennbare Gase und Schwefelwasserstoff sowie Zubehör*. Sonderdruck General Monitors 9776 Whithorn Drive Houston Tx 77095, USA

[39] E. T. Hayes, A. Galal, H. B. Mark jr.; *The development of a sampler-sensor using a vanadium-oxinate-polymer*. Talanta 42 (1995) 873-877

[40] H. Tyras; *Spectrophotometric determination of methyl alcohol in the atmosphere*. Z. ges. Hyg. 35 (1989) 96-97

[41] Y. Maeda, Y. Fujio, T. Suetaka, M. Munemori; *Selective gas chromatographic determination of trace amounts of alcohols in ambient air*. Analyst 113 (1988) 189-191

[42] T. Qin, X. Xu, T. Polak, V. Pacakova, K. Stulik, L. Jech; *A simple method for the trace determination of methanol, ethanol, acetone and pentane in human breath and in the ambient air by preconcentration on solid sorbents followed by gaschromatography*. Talanta 44 (1997) 1683-1690

[43] I.-R. Johansen, G. Lines, A. Honne, T. Midtgaard; *Calibration on an FT-IR-Spektrometer for ambient air monitoring using PLS*. Appl. Spectrosc. 51 (1997) 1540-1546

[44] E. A. Druyan; *Determination of methanol in air*. Gig. Sanit. (1985) 57

[45] S. Girotti; *A sensitive continuous-flow bioluminescent system for determining ethanol in serum and saliva.* Anal. Chim. Acta 183 (1986) 187-196

[46] N. W. Cornell, R. L. Veech; *Enzymatic measurement of ethanol or NAD in acid extracts of biological samples*. Anal. Biochem. 132 (1983) 418-423

[47] F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcaral; *Individual and simultanous determination of ethanol and acetaldehyd in wines by flow injection analysis and immobilized enzymes*. Anal. Chem. 59 (1987) 1859-1863

[48] P. J. Worsfold, J. Ruzicka, E. H. Hansen; *Rapid automated enzymatic method for the determination of alcohol in blood and beverages using flow injection analysis*. Analyst 106 (1981) 1309-1317

[49] M. D. Smith, C. L. Olson; *Differential amperometric determination of alcohol in blood or urine using alcohol dehydrogenase*. Anal. Chem. 47 (1975) 1074 - 1076

[50] J. Bailer, K. de Hueber; *Automatische Bestimmung von Methanol in Wein*. Mitt. Klosterneuburg 37 (1987) 57-59

[51] T. Iwachido, K. Ishimaru, T. Toli; *High performance liquid chromatographic determination of alcohol in alcoholic drinks with a conductometric detector*. Anal. Sci. 2 (1986) 495-496

[52] S. Upadhyay, V. K. Gupta; *Reagent system for the spectrophotometric determination of methanol in environmental an biological samples*. Analyst 109 (1984) 1427

[53] J. R. Galensa, G. Müller, A. Schirmer, H. Stadler; *Bestimmung von Lebensmittel-inhaltstoffen durch HPLC-Enzymreaktor-Kopplung*. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 42 (1988) 84-85

[54] W. Künnecke, R. D. Schmid; *Gas-diffusion dilution flow-injection method for the determination of ethanol in beverages without sample pretreatment*. Anal. Chim. Acta 234 (1990) 213-220

[55] G. Osann; *Biochemische Methoden*. Poggendorfs Ann. 67 (1845) 372-375

[56] P. Karlson; *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissen-schaftler*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1984

[57] Boehringer; *Methods of biochemical analysis and food analysis*. Boehringer, Mannheim 1987

[58] D. Voet, J. G. Voet; *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1994

[59] W. Hartmeier; *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer-Verlag, Berlin 1986

[60] J. Heinzler; *Grundriß der physiologischen Chemie I und II*. Troptonwerke, Köln 1983

[61] O. Müller; *Grundlagen der Biochemie I.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977

[62] P. Jacob; *Wasserstoffperoxid in der atmosphärischen Gas- und Flüssigphasen-chemie*. Dissertation, Universität Dortmund, 1987

[63] U. Quaß; *Neue Anwendungen des Chemilumineszenz-Phänomens zur Erfassung reaktiver Spezies in atmosphärischen und technischen Aerosolen.* Dissertation, Universität Dortmund, 1994

[64] L. Prencipe, E. Jaccheri, C. Manzati; *Enzymic ethanol assay: new colorimetric method based on measurement of hydrogen peroxide*. Clin. Chem. 33 (1987) 486-489

[65] F. Preuschoff, M. Spohn, G. Blankenstein, K.-H. Mohr, M.-R. Kula; *Chemiluminometric hydrogen peroxide sensor for flow injection analysis*. Fresenius J. Anal. Chem. 346 (1993) 924-929

[66] Y.-X. Ci, J.-K. Tie, F.-J. Yao, Z.-L. Liu, S. Lin, W.-Q. Zheng; *Catalytic behaviour of iron(II)-oxime complexes in the chemiluminescence reaction of luminol with hydrogen peroxide*. Anal. Chim. Acta 277 (1993) 67-72

[67] K.-H. Gundermann; *Luminol and related compounds.* Chemiluminescence in organic chemistry in: J. G. Burr (ed.), Chemi- and Bioluminescence, Clinical and Biochemical Analysis Vol. 16, Marcel Dekker New York 1983

[68] H. Brandl, S. Albrecht, M. Haufe; *Neue Experimente zur Chemolumineszenz*. Chemie in unserer Zeit 27 (1993) 303-305

[69] H.-H. Perkampus; *Absorptions- und Lumineszenzspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich.* Ullmann´s Enzyklopädie der Technischen Chemie, Bd.5, 4. Auflage, Analysen- und Meßverfahren, 369-402

[70] K. Honda, K. Migaguchi, H. Nishino, H. Tanaka, T. Yao, K. Ima; *High-Performance Liquid Chromatography followed by peroxyoxalate chemiluminescence detection of acetylcholine and choline utilizing immobilized enzymes.* Anal. Biochem. 153 (1986) 50-53

[71] T. G. Burdeo, W. R. Seitz; *Mechanism of cobalt catalysis of luminol chemi-luminescence*. Anal. Chem. 47 (1975) 1639-1643

[72] M. Isacsson, G. Wettermark; *Chemiluminescence in analytical chemistry*. Anal. Chim. Acta 68 (1974) 339-362

[73] E. H. White, O. Zafiriou, H. H. Kägi, J. H. M. Hill; *Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction*. J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 940-942

[74] W. Adam; *Biologisches Licht*. Chemie in unserer Zeit 7 (1973) 182-191

[75] S. Albrecht, H. Brandl, C. Schönfels; *Angewandte Biolumineszenz: Luciferasen in der biochemischen Analytik*. Chemie in unserer Zeit 26 (1992) 63-69

[76] K. D. Gundermann; *Chemilumineszenz*. Chemie in unserer Zeit 4 (1970) 55-60

[77] S. Sattar, J. R. Epstein; *Interaction of luminol with the oscillating system H_2O_2-KSCN-$CuSO_4$-NaOH*. J. Phys. Chem. 94 (1990) 275-277

[78] S. Albrecht, H. Brandl, W. Adam; *Chemilumineszenzreaktionen*. Chemie in unserer Zeit 24 (1990) 227-238

[79] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1984

[80] J. Macaire; *Memoire sur la phosphorescence des lampyres*. Ann. de Chimie 17 (1821) 151

[81] B. Radziszewski; *Untersuchungen über Hydrobenzamid, Amarin und Lophin*. Chem. Ber. 10 (1877) 70-75

[82] G. Jander, E. Blasius; *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*. S. Hirzel Verlag Stuttgart, 12. Auflage 1985

[83] H. Kaiser; *Zum Problem der Nachweisgrenze*. Z. Anal. Chem. 209 (1965) 1-18

[84] G. G. Guilbault, P. J. Brignac, M. Junau; *New substrate for the fluorimetric determination of oxidative enzymes*. Anal. Chem. 40 (1968) 1256-1263

[85] M. P. Keuken, F. P. Bakker, W. A. Lingerak, J. Slanina; *Flow injection analysis of hydrogen peroxide, sulfite, formaldehyde and hydroxymethane sulfonic acid in precipitation samples*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 31 (1987) 263-279

[86] T. J. Kelly, P. H. Daum, S. E. Schwartz; *Measurements of peroxides in cloud water and rain*. J. Geophys. Res. 90 (1985) 7861-7871

[87] A. L. Lazrus, G. L. Kok, J. A. Lind, S. N. Gitlin, B. G. Heikes, R. E. Shetter; *Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in air*. Anal. Chem. 58 (1986) 594-597

[88] H. Engelhardt, B. Lillig; *Practical applications of open tubes in liquid chromatography*. J. High Res. Chrom. 8 (1985) 531-534

[89] T. W. Ellis, J. B. Hill; *An automated fluorometric procedure for the enzymatic determination of ethanol in fingertip blood*. Clin. Chem. 15 (1969) 91-101

[90] A. Fernandez, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel; *Voltammetric-enzymatic determination of ethanol in whole blood by flow injection analysis*. J. Anal. Chem. 327 (1987) 552-554

[91] F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel; *Individual and simultaneous enzymatic determination of ethanol and acetaldehyde in wines by flow-injection analysis*. Anal. Chim. Acta 185 (1986) 57-64

[92] A. M. Almuaibed, A. Townshend; *Enzymic methods for the determination of ethanol based on linear and cyclic flow-injection systems*. Anal. Chim. Acta 214 (1988) 161-172

[93] A. M. Almuaibed, A. Townshend; *Determination of acetaldehyde by flow injection analysis with soluble or immobilized aldehyde dehydrogenase*. Anal. Chim. Acta 198 (1987) 37-44

[94] J. Ruz, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel; *Flow injection analysis*: *use of immobilized enzymes for the determination of ethanol in serum*. Analyst 112 (1987) 259-261

[95] T. Ataka, A. Mori, F. Tamiya, J. Karube; *Amperometric detection of alcohol in beer using a flow cell and immobilized alcohol dehydrogenase*. Anal. Chem. 63 (1991) 2391-2393

[96] T. Hayashi, S.-H. Hyon, W.-J. Cha, Y. Ikada; *Immobilisation of thiol proteases onto porous poly(vinylalcohol)beads*. Polymer J. 25 (1993) 489-497

[97] Y. Yamazaki, H. Maeda; *The co-immobilisation of NAD and dehydrogenases and ist application to bioreactors for synthesis and analysis*. Agric. Biol. Chem. 46 (1982) 1571-1581

[98] M. Hedenfalk, B. Mattiasson; *Sequential injection analysis of ethanol using immobilized alcohol dehydrogenase*. Anal. Let. 29 (1996) 1109-1124

[99] Y. Yao, Y. Kobayashi, S. Musha; *Continuous-flow analysis for ethanol with immobilized alcohol dehydrogenase*. Anal. Chim. Acta 139 (1982) 363-366

[100] G. G. Guilbault, M. H. Sadar; *Preparation and analytical uses of immobilized enzymes*. Am. Chem. Soc. 12 (1979) 344-350

[101] G. G. Guilbault; *Analytical uses of immobilized enzymes*. Marcel Dekker Inc., New York 1984, 77-111

[102] E. Tagliaro, G. Schavon, R. Dorizzi, M. Marigo; *Development of post-column enzymic reactors with immobilized alcohol oxidase for use in the high-performance liquid chromatographic assay of alcohols with electrochemical detection*. J. Chrom. 63 (1991) 11-21

[103] W. Krakowiak, M. Jach, J. Korona, H. Sagier; *Immobilisation on activated aluminium oxide*. Starch 36 (1984) 396-398

[104] J. Koga, K. Yamaguchi, S. Gondo; *Immobilization of alkaline phosphatase on activated alumina particles*. Biotech. Bioeng. 26 (1984) 100-103

[105] P. Cremonest, R. Bovara; *High performance enzyme reactors*. Biotech. Bioeng. 18 (1976) 1487-1491

[106] B. Adu-Amankwa, A. Constantinides, W. R. Vieth; *Enzymatic modification of vegetable protein*: *Immobilisation of penicillium dupont*: *Enzyme on reconstituted collagen and the use of the immobilized enzyme complex for solubilizing vegetable protein in a recycle reactor*. Biotech. Bioeng. 23 (1981) 2609-2627

[107] P. R. Coulet, J. H. Julliard, D. C. Goutheron; *A mild method of general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films*. Biotech. Bioeng. 16 (1974) 1055-1069

[108] E. L. Gulberg, G. D. Christian; *The use of immobilized alcohol oxidase in the continious flow determination of ethanol with an oxygen electrode*. Anal. Chim. Acta 123 (1981) 125-133

[109] P. R. Coulet, D. C. Goutheron; *Enzymes immobilized on collagen membranes.* J. Chrom. 215 (1981) 65-72

[110] T. Wieland, H. Determan, K. Bünning; *Über unlösliche in Polyacrylamidgel fixierte Enzyme*. Z. Naturforschung 21b (1966) 1003

[111] H.-H. Kurth, S. Gäb, W. V. Turner, A. Kettrup; *A high-performance liquid chromatography system with an immobilized enzyme reactor for detection of hydrophilic organic peroxides*. Anal. Chem. 63 (1991) 2586-2589

[112] D. N. Gray, M. H. Keyes, B. Watson; *Immobilized enzymes in analytical chemistry.* Anal. Chem. 49 (1977) 1067A-1078A

[113] L. D. Bowers, P. W. Carr; *Applications of immobilized enzymes*. Anal. Chem. 48 (1976) 544A-559A

[114] R. S. Scfreen, D. A. Hanna, L. D. Bowers, P. W. Carr; *Analytical aspects of immobilized enzyme columns*. Anal. Chem. 49 (1977) 1929-1939

[115] P. Linares, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel; *Integrated reaction and photometric detection with enzymes immobilized in the flow cell of a flow-injection system*. Anal. Chim. Acta 230 (1990) 199-202

[116] D. Moscone, M. Mascini; D*etermination of superoxid dismutase activity with an electrochemical oxygen probe*. Anal. Chim. Acta 211 (1988) 195-204

[117] R. Q. Thomson, H. Kim, Ch. E. Miller; *Comparison of immobilized enzyme reactors for flow-injection systems*. Anal. Chim. Acta 198 (1987) 165-172

[118] B. F. Rocks; *Analytical uses of insolubilized enzyme systems as illustrated by horseradish peroxidase covalently bound to polystyrene beads*. Proc. Soc. Anal. Chem. 10 (1973) 1641-1650

[119] H. H. Weetall; *Trypsin and papain covalent coupling to porous glass*: *Preparation and characterization*. Science 166 (1969) 615-617

[120] M. Masoom, A. Townshend; *Determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase*. Anal. Chim. Acta 174 (1985) 293-297

[121] L. Campanella, M. Tomassetti, B. Rappuoli, M. R. Bruni; *Chemical enzyme immobilization*: *Procedures and apparatures for electroenzymatic analysis*. Int. Clin. Prod. Sept./Oct. (1985) 44-50

[122] J. Valdez-Gonzales; *Untersuchungen zur Anwendung immobilisierter Enzyme und Reagentien zur Probenahme und Bestimmung atmosphärischer Peroxide*. Dissertation, Universität Dortmund, 1991

[123] X. Xie, A. A. Suleiman, G. G. Guilbault; *Flow-injection determination of ethanol by fiber-optic chemiluminescence measurement*. Anal. Chim. Acta. 266 (1992) 325-329

[124] M. Masoom, A. Townshend; *Determination of glucose in blood by flow injection analysis and an immobilized glucose oxidase column*. Anal. Chim. Acta 116 (1984) 111-118

[125] G. Iwinski, D. R. Jenke; *Determination of alcohols in pharmaceuticals by ion exclusion chromatography*. J. Chrom. 392 (1987) 397

[126] M. B. Masters; *Latest development in ion-chromatography*. Anal. Proc. 21 (1984) 322

[127] Macherey-Nagel; *HPLC - Flüssigchromatographie*. Düren 1991

[128] K. K. Unger; *Handbuch der HPLC, Teil 1, Leitfaden für Anfänger und Praktiker*. GIT-Verlag, Darmstadt 1989

[129] G. Aced, H. J. Möckel; *Liquid-Chromatographie - Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1991

[130] M. H. Ho; *Use of enzymes for the determination of environmental pollutants.* Intern. J. Environ. Anal. Chem. 31 (1987) 1-9

[131] H.-O. Beutler, G. Michal; *Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln*. Z. Anal. Chem. 284 (1977) 113-117

[132] A. Maquiera, M. D. Luque de Castor, M. Valcarcel; *Simultaneous enzymic determination of ethanol and methanol by flow-injection analysis.* Microchem. J. 36 (1987) 309-315

[133] E. Merck; *Bioquant Ethanol*. Merck Darmstadt 1993

[134] A. F. Gomez, J. R. Polonio, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel; *Automated enzymatic-fluorimetric determination of ethanol in blood by flow injection analysis.* Clin. Chim. Acta 148 (1985) 131-137

[135] J. Klavons, R. D. Bennett; *Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins*. J. Agric. Food Chem. 34 (1986) 597-599

[136] T. D. Gibson, J. R. Woodward; *Automated determination of ethanol using the enzyme alcoholoxidase*. Anal. Proc. 23 (1986) 360-362

[137] J. Namiesnik; *Permeation devices for the preparation of standard gaseous mixtures*. Chromatographia 17 (1983) 47-48

[138] M. Bownik, J. Namiesnik, L. Torres; *Device for the preparation of standard gaseous mixtures*. Chromatographia 17 (1983) 503-504

[139] R. S. Barratt; *The preparation of standard gas mixtures*. Analyst 106 (1981) 817-849

[140] G. O. Nelson (Ed.); *Controlled test atmosphere - Principles and techniques*. Ann. Arbor Science, Publishers Inc., Ann Arbor 48106

[141] J. Namiesnik; *Generation of standard gaseous mixtures*. J. Chrom. 300 (1984) 79-108

[142] B. J. Brookes; *Standard atmosphere generator*: *A dynamic system for the controlled dillution of organic vapours in air*. Analyst 106 (1981) 403-411

[143] L. Torres, J. Mathieu, M. Frikka; *Stabilization of a standard gas mixture generator with diffusion tubes*. Chromatographia 14 (1981) 712-713

[144] D. P. Lucero; *Performance characteristics of permeation tubes*. Anal. Chem. 43 (1971) 1744-1749

[145] A. Treckentrup, D. Klockow; *Preparation of refillable permeation tubes*. Anal. Chem. 50 (1978) 1728-1729

[146] U. Quaß, M. Schilling; *A new test gas generator for atmospheric trace compounds*. Z. Anal. Chem. 350 (1994) 461-466

[147] P. W. Atkins; *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1987

[148] R. Atkinson, W. P. L. Carter; *Kinetics and mechanisms of the gas-phase reaction of ozone with organic compounds under atmospheric conditions*. Chem. Rev. 84 (1984) 437-470

[149] C. Celotto, P. Remler, H. Marhold; *Ozon in der Troposphäre; Bildung, Reaktionen und Auswirkungen auf die Biosphäre*. ÖChemZ. 12 (1987) 286-292

[150] R. Zanella; *Immissionsanalytik von Acrylsäure und Acrylsäureestern*. Dissertation, Universität Dortmund, 1994

[151] M. Schilling; pers. Mitteilungen

[152] D. Helmig, J. Greenberg; *Artifact formation from the use of potassium-iodide-based ozone traps during atmospheric sampling of trace organic gases*. J. High Res. Chrom. 18 (1995) 15-18

[153] T. Hoffmann; *Entwicklung eines Verfahrens zur Messung luftgetragener biogener Kohlenwasserstoffe und seiner Anwendung zur Untersuchung von Emissionen und Abbau von Terpenen in Waldbeständen*. Dissertation, Universität Dortmund, 1992

[154] R. L. Tanner, G. V. Markovits, E. M. Ferreri, T. J. Kelly; *Sampling and determination of gas-phase reaction with nitric oxide*. Anal. Chem. 58 (1986) 1857-1865

[155] Meyers großes Taschenlexikon; B. I. Taschenbuchverlag, Mannheim 1995, Bd. 19, S. 156

[156] Microsoft; *Encarta*. 1999

Hiermit erkläre ich, daß ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.