

**Freisetzung von aromatischen
Aminen aus Bauwerksabdichtungen
Erarbeitung eines Verfahrens zur
analytischen Quantifizierung als
Grundlage für die Bewertung im
Rahmen der abZ**

T 3367

T 3367

Dieser Forschungsbericht wurde mit modernsten Hochleistungskopierern auf Einzelanfrage hergestellt.

Die in dieser Forschungsarbeit enthaltenen Darstellungen und Empfehlungen geben die fachlichen Auffassungen der Verfasser wieder. Diese werden hier unverändert wiedergegeben, sie geben nicht unbedingt die Meinung des Zuwendungsgebers oder des Herausgebers wieder.

Die Originalmanuskripte wurden reprotechnisch, jedoch nicht inhaltlich überarbeitet. Die Druckqualität hängt von der reprotechnischen Eignung des Originalmanuskriptes ab, das uns vom Autor bzw. von der Forschungsstelle zur Verfügung gestellt wurde.

© by Fraunhofer IRB Verlag

2019

ISBN 978-3-7388-0288-7

Vervielfältigung, auch auszugsweise,
nur mit ausdrücklicher Zustimmung des Verlages.

Fraunhofer IRB Verlag

Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau

Postfach 80 04 69

70504 Stuttgart

Nobelstraße 12

70569 Stuttgart

Telefon (07 11) 9 70 - 25 00

Telefax (07 11) 9 70 - 25 08

E-Mail irb@irb.fraunhofer.de

www.baufachinformation.de

Fraunhofer-Institut für Bauphysik IBP
Forschung, Entwicklung,
Demonstration und Beratung auf
den Gebieten der Bauphysik
Zulassung neuer Baustoffe,
Bauteile und Bauarten
Bauaufsichtlich anerkannte Stelle für
Prüfung, Überwachung und Zertifizierung
Institutsleitung
Prof. Dr. Philip Leistner
Prof. Dr. Klaus Peter Sedlbauer

IBP-Abschlussbericht Nr. UHS-008/2018/282

Freisetzung von aromatischen Aminen aus Bauwerksabdichtungen

Erarbeitung eines Verfahrens zur analytischen Quantifizierung als Grundlage für die Bewertung im Rahmen der abZ

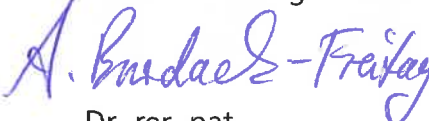
Durchgeführt im Auftrag des
Deutschen Instituts für Bautechnik (DIBt)
Frau Brigitte Strathmann
Frau Dr. Kathleen Buller
Kolonnenstraße 30 B
10829 Berlin
Forschungsvorhaben P 52-5-20.85.1 2009/17

Der Bericht umfasst
77 Seiten Text
11 Tabellen
45 Abbildungen

Andreas Schmohl
Sabine Hübner

Valley, 13. April 2018

Stellv. Abteilungsleiterin



Dr. rer. nat.
Andrea Burdack-Freitag

Gruppenleiterin



M. Sc.
Sabine Hübner

Bearbeiter



Dr. rer. nat.
Andreas Schmohl

Inhalt

1	Zusammenfassung und Fazit	3
2	Ausgangssituation und Ziele der Untersuchungen	9
2.1	Ausgangssituation	9
2.2	Ziel des Forschungsvorhabens	9
3	Methodik	11
3.1	Untersuchungsumfang Amine	11
3.2	Instrumentelle Analytik	15
3.2.1	Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)	15
3.2.2	Flüssigchromatografie (UPLC)	15
3.3	Festphasenextraktion (SPE)	15
3.3.1	SPE mit Umkehrphase (RP)	15
3.3.2	SPE mit Kationentauscher (XC)	15
3.4	Injektionsharz-Elution mittels Inversem Säulenversuch	15
3.4.1	Versuchsaufbau und Durchführung	15
3.4.2	Untersuchungsumfang Polyurethanharze	18
4	Ergebnisse und Diskussion	19
4.1	Instrumentelle Analytik	19
4.1.1	Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)	19
4.1.2	Flüssigchromatografie (UPLC)	21
4.1.3	Kalibrierung, Stabilität und Signal-Rausch-Verhältnis	32
4.2	Stabilität der Amine	42
4.3	Festphasenextraktion (SPE)	43
4.3.1	SPE mit Umkehrphase (RP)	43
4.3.2	SPE mit Kationentauscher (XC)	44
4.3.3	Einengen des SPE-Elutionsmittels (XC)	48
4.3.4	Zusammenfassung „Festphasenextraktion“	58
4.4	Amin-Freisetzung aus Polyurethanharzen (PUR)	64
4.4.1	PUR-Injektionsharz-Elution in Projektphase II	64
4.4.2	Vergleich mit Projektphase I	69

1 Zusammenfassung und Fazit

Ausgangssituation (Phase I)

Für die Bauwerksabdichtung werden häufig 2-Komponenten-Polyurethan-Systeme (Polyurethan = PUR) eingesetzt, die aus einer Polyol- und einer Diisocyanat-Komponente bestehen. Beide Komponenten werden mit Hilfe eines Applikationswerkzeugs bei der Injektion in einer Mischkammer zusammengeführt und vermischt. Sie reagieren erst am Einsatzort ab. Bei der Applikation der Bauwerksabdichtungsstoffe können organische Aminverbindungen entstehen und in Boden und Grundwasser freigesetzt werden.

In einer ersten Projektphase (DIBt-Fördernummer: P 52-5-20.85.1) wurden 2 PUR-Injektionsharze auf die Freisetzung von 16 Aminen sowie 6 Isocyanat-Derivate bezüglich ihrer Hydrolysegeschwindigkeit untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass

- die Hydrolyse der aromatischen Isocyanate rasch abläuft (Halbwertszeiten: 0,3 bis 15 min.);
- aliphatische Isocyanate langsamer hydrolysieren (Halbwertszeit von Cyclohexylamin: 60 min.);
- die UPLC-MS/MS-Analytik durch Matrixeffekte beeinträchtigt wird.
- eine Anreicherung der wasserlöslicheren Amine – beispielsweise der Diaminotoluole – auf einer Umkehrphase nicht möglich war.

Es wurde die These aufgestellt, dass die interessierenden Amine inklusive der wasserlöslichen Amine durch Festphasenextraktion mit einem Kationentauscher aufkonzentriert und von der störenden Matrix abgetrennt werden könnten.

Der vorliegende Bericht enthält die Ergebnisse der – auf den Ergebnissen der ersten Phase aufbauenden – zweiten Projektphase (Phase II). Für die zweite Projektphase wurde eines der beiden in Phase I verwendeten Harze ausgewählt, das aromatische Amine freisetzt und einen Matrixeffekt erzeugt (Harz A in Phase I).

Methodik in Phase II

In der zweiten Projektphase wurde die UPLC-MS/MS-Analytik von 16 auf 25 Amine – zuzüglich d5-Anilin als interner Standard – erweitert, darunter 19 aromatische Amine, 1 Imidazolin-Derivat, 1 Benzylamin-Derivat und 4 aliphatische Amine. Die 19 aromatischen Amine können weiter unterteilt werden in 3 besonders wasserlösliche Amine, 3 besonders oxidationsempfindliche Amine, Anilin, 3 chlorierte Aniline sowie 9 weitere aromatische Amine, die nicht den vorhergehenden Gruppen zugeordnet sind. Die Parameter der UPLC-MS/MS-Analytik, insbesondere die chromatographische Gradienten-Methode, wurden optimiert.

Die Entwicklung der Festphasenextraktion erfolgte mit Reinstwasser sowie mit Eluaten aus den Inversen Säulenversuchen (ISV-Eluate) der ersten Projektpha-

se vom November 2015. Die Gewinnung frischer matrixbelasteter ISV-Eluate (Februar 2018) erfolgte wieder mit Hilfe eines Inversen Säulenversuchs.

Das für den Inversen Säulenversuch verwendete Injektionsharz (Harz A) war extra für diese Untersuchung als Benchmark präpariert, um ganz bewusst hohe Freisetzungen an aromatischen Aminen sowie hohe Matrix-Konzentrationen in den ISV-Eluaten zu erhalten.

Den ISV-Eluaten wurden Amine zugesetzt, anschließend wurde die Mischung einer Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) unterzogen. Die ISV-Eluate sowie die SPE-Eluate wurden mittels Ultra-hochleistungschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) auf das Vorkommen der 26 organischen Amine untersucht.

UPLC-MS/MS-Analytik der einzelnen Amine

Zwei chromatographische Methoden, eine isokratische und eine Gradienten-Methode, wurden verwendet und miteinander verglichen. Beide UPLC-Methoden haben eine Dauer von 15 min..

Mit der Gradienten-Methode werden bei allen 26 Aminen die Massenübergangspeaks für die quantitative Auswertung basisliniengetrennt. Die isokratische Methode führt bei 16 Aminen zu einer höheren analytischen Empfindlichkeit. Außerdem ist sie besser geeignet, die Phenylendiamin-Isomere zu trennen. Größter Nachteil der isokratischen Methode ist die ungenügende Trennung der Chlor-2-methylanilin-Isomere.

Bei 16 stabilen aromatischen Aminen sowie bei 2-Phenylimidazolin und Isophorondiamin wird bei 5 µL Injektionsvolumen und in Kombination mit einer Anreicherung auf einer Kationentauscher-Festphase um Faktor 25 eine Bestimmungsgrenze unter dem analytischen Zielwert von 0,1 µg/L erreicht. Eine Validierung steht noch aus. Bei Bedarf kann das Injektionsvolumen (um bis zu Faktor 20) erhöht werden, soweit Matrixeffekte dem nicht entgegenstehen.

2,4,5-Trimethylanilin weist zwar eine sehr hohe analytische Empfindlichkeit auf (hohe Steigung der Kalibriergeraden), die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze wird jedoch durch die zu geringe Selektivität der Massenübergänge und das in der Folge zu hohe Rauschen limitiert (schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis). Eine Bestimmungsgrenze unter dem analytischen Zielwert von 0,1 µg/L kann mit hohen Injektionsvolumina erreicht werden.

Drei aromatische Amine (1,4-Phenylendiamin; 1,5-Naphtalendiamin; o-Tolidin), welche leicht zum entsprechenden Chinon-Derivat oxidiert bzw. dehydriert werden, degradieren innerhalb weniger Tage bis Stunden. Für eine reproduzierbare Analytik sind sie zu instabil.

Isophorondiamin neigt extrem zu Verschleppungseffekten und wurde auch in den Blindwert-Kontrollen gefunden. Die Empfindlichkeit der Analytik ist hoch und die Anreicherung auf einer Kationentauscher-Festphase funktioniert gut. Auch 4,4'-Diaminodiphenylsulfid wurde gelegentlich in den Blindwert-

Kontrollen gefunden, eine Verschleppung tritt jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen und in sehr geringem Ausmaß auf.

1,3-Benzendimethanamin ist ein Benzylaminderivat. 2-Phenylimidazolin ist eine heterocyclische Verbindung, welche ebenfalls als Benzylaminderivat betrachtet werden kann. Beide Amine verhalten sich bei der SPE aufgrund ihrer hohen Basizität ähnlich wie aliphatische Amine. Bei der UPLC-MS/MS-Analytik bzw. der Elektrosprayionisation unterscheiden sich die beiden Amine jedoch deutlich: Während Empfindlichkeit und Selektivität der UPLC-MS/MS-Analytik bei 2-Phenylimidazolin sehr hoch sind (Massenübergang 147 > 44), reicht die Empfindlichkeit bei 1,3-Benzendimethanamin bisher bei weitem nicht aus, um eine Bestimmungsgrenze unter dem analytischen Zielwert von 0,1 µg/L zu erreichen.

Bei drei der vier untersuchten aliphatischen Amine (Cyclohexylamin; 1,4-Cyclohexandiamin; Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung) sowie bei den oxidationsempfindlichen aromatischen Aminen (1,4-Phenylendiamin; 1,5-Naphthalendiamin; o-Tolidin) ist die Empfindlichkeit nicht ausreichend, um in Kombination mit einer Anreicherung um Faktor 25 eine Bestimmungsgrenze unter dem analytischen Zielwert von 0,1 µg/L zu erreichen. Evtl. können bei diesen Aminen die Parameter für die Massenübergänge, die Ionisierung und die Kollisionsenergie weiter optimiert werden.

Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE)

Aufgrund der starken Matrixeffekte ist eine Vorreinigung der ISV-Eluate zwingend notwendig. Die Untersuchungen in Phase II bestätigen, dass 10 gut wasserlösliche Amine der insgesamt 26 interessierenden Amine auf einer Umkehrphase (reversed phase, RP) nicht quantitativ angereichert werden können. Daher wurde in Phase II die Festphasenextraktion mit einem Kationentauscher (cation exchange, XC) eingesetzt und erfolgreich auf die Extraktion der 23 stabilen Amine angepasst. Die Bindung an die XC-Festphase stellte sich insbesondere für die aliphatischen Amine als sehr fest heraus. Die Elution von 25 der 26 interessierenden Amine konnte mit einer methanolischen Isopropylamin-Lösung erreicht werden (1,5-Naphthalendiamin war degradiert). Die Wiederfindung ist bei Verwendung von (verdünntem) Leitungswasser höher beziehungsweise gleich hoch wie bei Verwendung von Reinstwasser.

Bei Verwendung von methanolischer 1 M Isopropylamin-Lösung muss das Isopropylamin vor der Injektion in die UPLC aus der Lösung entfernt bzw. abgedampft werden. Die Überprüfung des erfolgreichen Entfernens des Isopropylamins erfolgt durch Zugabe eines Aliquots zu methanolischer Bromthymolblau-Lösung.

Die Verwendung von d5-Anilin als Interner Standard für die SPE kann nicht empfohlen werden, da die Standardabweichungen bzw. Fehlerbalken der Messdaten bei d5-Anilin (wie auch beim Anilin) wesentlich höher sind als beispielsweise bei 4,4'-MDA.

Inverse Säulenversuche (ISV)

In die mit einer Feinsand-Wasser-Mischung gefüllte Inverse Säule wurden 400 mL PUR-Harz injiziert. Als ISV-Elutionsmittel wurde in Phase II verdünntes Leitungswasser bzw. eine Mischung von 10 L Leitungswasser und 40 L Reinstwasser eingesetzt. Die Elutionsdauer betrug 3,6 h bei einem Volumenstrom von 3,6 L/h (entspricht 13 L Wasser).

Das ISV-Eluat wurde direkt nach dem Inversen Säulenversuch (ohne SPE) sowohl angesäuert als auch ohne Säurezugabe mittels UPLC-MS/MS auf die 26 Amine untersucht. Die Säurezugabe beeinflusst weder den Verlauf noch die Höhe der 4,4'-MDA-Konzentration; die maximale 4,4'-MDA-Konzentration betrug 14 µg/L (neutral) bzw. 12 µg/L (sauer).

Bereits vor dem Anstieg der 4,4'-MDA-Konzentration wird bei den MDA-Massenübergängen $199 > 106$ und $199 > 183$ jeweils ein Signal erhalten, das 2,4'-MDA zugeordnet wurde. Der Verlauf der 2,4'-MDA-Konzentration unterscheidet sich von dem der 4,4'-MDA-Konzentration. Zwischen angesäuert und neutraler Probe gibt es wie bei 4,4'-MDA keinen Unterschied.

Das in Phase II des Projektes eingesetzte Harz A wurde bereits in Phase I verwendet. Im November 2015 konnten im Eluat der Säule, in die das Harz A mit der kurzen Mischkammer injiziert wurde, 4,4'-MDA-Konzentrationen von bis zu 25 µg/L nachgewiesen werden. Die mit Phosphorsäure angesäuerten Probelösungen waren bei pH 2 über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen stabil. Eine Mischung aus mehreren Fraktionen mit einer durchschnittlichen 4,4'-MDA-Konzentration von etwa 10 µg/L wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und in Phase II des Projektes für die Festphasenextraktionen verwendet. Bei der Festphasenextraktion mit Kationentauscher im August 2017 wurden etwa 150 µg/L ermittelt, also eine 15-fach höhere 4,4'-MDA-Konzentration als 21 Monate zuvor. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass 4,4'-MDA in Wasserproben bei pH 2 über Jahre nachweisbar ist. Zum anderen ist es ein Hinweis darauf, dass in der Mischfraktion Oligokondensate enthalten waren, die in der Zwischenzeit hydrolysiert sind und 4,4'-MDA freisetzen.

Aufreinigung der ISV-Eluate mittels Festphasenextraktion (SPE)

Die im Jahr 2017 gewonnenen ISV-Eluate enthalten noch mehr Matrix als die im Jahr 2015 gewonnenen ISV-Eluate. Die These bzw. Annahme, dass die störenden Matrixbestandteile durch SPE mit Kationentauschern (XC-SPE) von den interessierenden Aminen abgetrennt werden können, stellte sich als nicht zutreffend heraus. Durch die XC-SPE (eingesetzter Anreicherungsfaktor: 125) werden in großen Mengen unbekannte Amine (vermutlich Aminoalkohole) angereichert, die die Chromatographie massiv stören. Die Chromatogramme waren nicht auswertbar; selbst durch Standardaddition und Verdünnungsreihen konnten keine verwertbaren UPLC-MS/MS-Daten generiert werden. Als Ursache für den stärkeren Matrixeffekt kommt die Elution mit 1:5-verdünntem Leitungswasser (Verdünnung mit Reinstwasser) anstelle von unverdünntem Leitungswassers in Betracht. Durch den geringeren Salz- und

Kieselsäuregehalt kann der Auslaugeeffekt des ISV-Elutionsmittels verstärkt sein.

Die Färbung der Bromthymolblau-Lösungen (zur Überprüfung der erfolgreichen Entfernung des Isopropylamins im Anschluss an die XC-SPE) weist darauf hin, dass in den eingegengten und mit Acetonitril auf 2 mL aufgefüllten ISV-SPE-Eluaten einiger ISV-Fractionen eine Konzentration von etwa 2 mM Aminogruppen auch durch wiederholtes Einengen nicht aus der Lösung entfernt werden können. Die zurückgerechnete Konzentration an Aminogruppen im ISV-Eluat (16 $\mu\text{mol/L}$) ist damit etwa um den Faktor 230 höher als die gemessene 4,4'-MDA-Konzentration (14 $\mu\text{g/L}$ bzw. 0,07 $\mu\text{mol/L}$).

Fazit

Es hat sich bestätigt, dass die Ultrahochleistungsflüssigchromatografie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie zur Analyse der aromatischen Amine sehr gut geeignet ist.

Drei der 26 interessierenden Amine (1,4-Phenylendiamin, 1,5-Naphthalendiamin und o-Tolidin) sind für eine robuste Analyse zu instabil. d5-Anilin ist kein geeigneter Interner Standard für die SPE.

Da bei Inversen Säulenversuchen mit PUR-Injektionsharzen mit anschließender Festphasenextraktion mit einem Kationentauscher zugleich auch die störende Matrix angereichert wird und mit der Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase ein großer Teil der Amine nicht oder nur ungenügend erfasst werden können, gibt es keinen einfachen Weg für die Entwicklung eines robusten, nachweisstarken Analysenverfahrens für alle 23 stabilen interessierenden Amine. 15 der 23 stabilen Amine können auf einer Umkehrphase gebunden und damit (voraussichtlich) von hochpolaren Aminoalkoholen abgetrennt werden.

Die Verwendung von 1:5-verdünntem Leitungswasser als ISV-Eluent hat sich nicht bewährt. Die Matrixeffekte sind im Vergleich zur ISV-Elution mit Leitungswasser verstärkt. Leitungswasser verbessert tendenziell die Wiederfindung sowohl bei der Umkehrphasen-SPE als auch bei der Kationentauscher-SPE (solange deren Kapazität nicht überschritten wird).

Bei der Kombination von Kationentauscher-SPE und Leitungswasser als ISV-Eluent ist eine Aufkonzentrierung um den Faktor 25 möglich. Dieser Aufkonzentrierungsfaktor ist in Bezug auf die Bestimmungsgrenze bei 18 Aminen ausreichend.

4,4'-MDA und 2,4'-MDA können aufgrund der hohen Empfindlichkeit des instrumentellen Analysenverfahrens und der hohen Selektivität der Massenübergänge ohne Aufkonzentrierung gemessen werden. Ohne Aufkonzentrierung bleiben die Matrixeffekte für die Analyse auf 4,4'-MDA und 2,4'-MDA in einem akzeptablen Bereich, so dass Standardadditionsversuche auswertbar bleiben. Mit einer auf MDA optimierten chromatographischen Methode kann die Analysendauer auf 10 min. reduziert werden, so dass klassische Stan-

dadadditionsversuche ökonomisch vorteilhafter sind als die Aufreinigung der ISV-Eluate mittels SPE.

Insgesamt ist eine Diskussion darüber nötig, welche Amine im Rahmen der allgemeinen bauaufsichtlichen Zulassung (abZ) mit dem angestrebten Gesamtverfahren erfasst werden sollen und welcher Aufwand grundsätzlich als angemessen erachtet wird.

Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass bei hochemittierenden Injektionsharzen das Gesamtverfahren aufgrund hoher Emissionen an nicht substanzspezifisch erfassten Aminen an Grenzen stößt. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass das verwendete, gezielt für die Untersuchungen ausgewählte Injektionsharz (Harz A) absichtlich besonders hohe Emissionen an 4,4'-MDA und anderen Stoffen aufweist. Falls die Freisetzung von MDA mit der Freisetzung von Matrix-Aminen korreliert, besteht die Hoffnung, dass zumindest bei gering 4,4'-MDA-emittierenden Injektionsharzen die Konzentration an Matrixaminen klein genug ist, um robuste Resultate zu erhalten.

Gut wasserlösliche Amine – wie beispielsweise Aminoalkohole – können mittels RP-SPE von den lipophileren Analyten abgetrennt werden. Einige gut wasserlösliche aromatische Amine (2,6-TDA, 2,4-TDA, 1,3-Phenylendiamin) sowie viele stark basische Amine (aliphatische Amine, Benzylamine, Imidazoline) verhalten sich ähnlich hydrophil wie Aminoalkohole und können somit mit der RP-SPE nicht bzw. nicht zuverlässig erfasst werden. Noch zu klären ist, ob auch Matrixbestandteile ohne Aminogruppen bei der Instrumentellen Analytik stören. In diesem Fall hilft auch die Durchführung der RP-SPE nicht, um die Analyten von der störenden Matrix abzutrennen.

Ohne Kenntnis der Zusammensetzung der Matrix ist eine Verbesserung der Abtrennung der Analyten von der Matrix kaum möglich. Sicher ist, dass (wie im Fall des eingesetzten Harzes A) im ISV-Eluat potenziell aminogruppenhaltige Substanzen enthalten sein können und diese bei der Instrumentellen Analytik stören können. Eine sehr hohe Aufkonzentrierung (> Faktor 25) wird i. d. R. nicht zielführend sein, da mit den Analyten potenziell auch störende Matrixkomponenten angereichert werden.

Die Untersuchung von marktgängigen, niedrig-emittierenden PUR-Injektionsharzen mit dem Gesamtverfahren aus

1. Inversem Säulenversuch mit Leitungswasser als ISV-Eluent,
2. SPE mit Sulfonsäure-Kationentauscher (50 mL => 2 mL),
3. Abdampfen des Isopropylamins aus dem SPE-Eluenten sowie
4. UPLC-MS/MS (Injektionsvolumen 5 µL)

ergäbe weitere Hinweise, ob das Gesamtverfahren prinzipiell für zulassungsfähige PUR-Injektionsharze anwendbar ist. Wie die potenziell hohen Konzentrationen an unbekanntem Aminen – welche die Instrumentelle Analytik stören (können) – zu bewerten sind, muss im Fachgremium diskutiert werden.

Das Gesamtverfahren eignet sich für die Untersuchung von Trinkwasser und anderen wässrigen Proben auf Amine. Ab welcher Salzfracht im Verhältnis zur Austauschkapazität des Kationentauschers das Rückhaltevermögen für Amine abnimmt, ist noch genauer zu untersuchen. Eine Sättigung von 85 % ist unbedenklich, ein Durchbruch wurde bei keinem der 26 Analyten beobachtet.

2 Ausgangssituation und Ziele der Untersuchungen

2.1 Ausgangssituation

Polyurethane werden häufig in den Bereichen Bauwerksabdichtung und Kanalsanierung eingesetzt. Zu nennen sind hier Injektionsverfahren mit PUR-Harzen oder PUR-Schaumharzen, sowie Anwendungen zur Kanal- und Rohrsanierung wie Hutprofiltechnik oder Spachtel-, Verpress- und Linerverfahren.

Weil Bauwerksabdichtungen in direktem Kontakt mit Niederschlags-, Sicker-, Boden- und/oder Grundwasser stehen können, stellt sich die Frage nach ihren ökologischen Auswirkungen, d. h. ob diese Produkte bei Applikation oder während ihrer Lebenszeit einen negativen Einfluss auf Boden und Grundwasser ausüben. Für die Bewertung dieser Eigenschaften im Rahmen einer allgemeinen bauaufsichtlichen Zulassung (abZ) fehlt derzeit ein leistungsfähiges, zuverlässiges und vor allem validiertes Analysenverfahren. Der EU-Summen-Grenzwert für aromatische Amine in Trinkwasser beträgt 1,0 µg/L, für Einzelsubstanzen je 0,5 µg/L [Leß01].

Die Bestimmung ggf. freigesetzter Isocyanate ist über die Muttersubstanz nicht zuverlässig möglich, da Isocyanate in Gegenwart von Wasser, also bereits während der Elution, hydrolysieren [Sch16]. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist von den Umgebungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, evtl. Matrix) und der chemischen Struktur des Isocyanats abhängig; die Halbwertszeit liegt im Bereich von einigen Sekunden bis Stunden [Sch16]. Je nach Isocyanat können dabei kanzerogene, mutagene und/oder reproduktionstoxische Amine gebildet werden.

Die Untersuchungen im Rahmen dieses Berichts bauen auf den Ergebnissen des Forschungsberichts „Freisetzung von Isocyanaten und Aminen aus Bauwerksabdichtungen“ (DIBt-Fördernummer: P 52-5-20.85.1) auf [Sch16].

2.2 Ziel des Forschungsvorhabens

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur Bestimmung der aus den Bauwerksabdichtungen auf Polyurethan-Basis freigesetzten Isocyanate bzw. deren Hydrolyseprodukte (Amine). Die Ergebnisse der chemisch-analytischen Untersuchung können dann zur Bewertung der ökologischen Eigenschaften dieser Produkte herangezogen werden.

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten sollen zu einem Untersuchungsverfahren führen, mit dem in Laborversuchen gewonnene Eluate auf den Gehalt an Aminen untersucht werden können, die ihrerseits beim Einsatz von im Kanal-, Tunnel und Tiefbau verwendeten polyurethanbasierten Systemen entstehen. D. h. das angestrebte Gesamtverfahren soll:

- eine Bestimmungsgrenze $< 0,1 \mu\text{g/L}$ für alle kanzerogenen Amine besitzen, die für eine allgemeine bauaufsichtliche Zulassung von Bedeutung sind,

und

- robust gegenüber Matrixeinflüssen sein, die durch die Eluatgewinnung auftreten können, bzw. einen Vorschlag für die Abtrennung von Matrixbestandteilen enthalten, die durch die Eluatgewinnung auftreten können und die einen Einfluss auf die Anreicherung oder die Richtigkeit des Analyseergebnisses nehmen.

Die Bestimmung aromatischer Amine enthält häufig einen Derivatisierungsschritt [Leß01] [Mei00] [San11]. Ein Ziel des Forschungsvorhabens ist, ein instrumentelles Analysenverfahren bereitzustellen, das ohne Derivatisierung ausreichend nachweisstark und robust ist.

3 Methodik

In Phase II wurde die UPLC-MS/MS-Analytik von 16 auf 25 Amine – zuzüglich d5-Anilin als interner Standard – erweitert, darunter 19 aromatische Amine, 1 Imidazolin-Derivat, 1 Benzylamin-Derivat und 4 aliphatische Amine. Die 19 aromatischen Amine können weiter unterteilt werden in 3 besonders wasserlösliche Amine, 3 besonders oxidationsempfindliche Amine, Anilin, 3 chlorierte Aniline sowie 9 weitere aromatische Amine, die nicht den vorhergehenden Gruppen zugeordnet sind.

Die Polarität der untersuchten aromatischen Amine umfasst einen sehr großen Bereich: von 1,3-Phenyldiamin (3) als hochpolares, gut wasserlösliches aromatisches Amin bis zu 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan (24) und o-Tolidin (22) als schwach polare, lipophile aromatische Amine. Neben 20 schwach basischen aromatischen Aminen wurden 4 stark basische aliphatische Amine untersucht. Der pK_s -Wert der korrespondierenden Ammoniumsalze liegt zwischen 4 und 11.

Die Parameter der UPLC-MS/MS-Analytik, insbesondere die chromatographische Gradienten-Methode, wurden optimiert. Die Stabilität der Analytik sowie der Analyten wurde untersucht. Die Entwicklung der Festphasenextraktion erfolgte mit Reinstwasser sowie mit Eluaten aus den Inversen Säulenversuchen (ISV-Eluate) der ersten Projektphase vom November 2015. Zur Elution im Inversen Säulenversuch wird mit Reinstwasser verdünntes Leitungswasser eingesetzt (1:5-Verdünnung). Die Ergebnisse der früheren und der neuen Inversen Säulenversuche werden miteinander verglichen.

3.1 Untersuchungsumfang Amine

Die 26 Amine, die in Projektphase II für die Untersuchungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Strukturformeln der 26 Amine sind in Bild 1 (molare Masse < 140 g/mol) und Bild 2 (molare Masse >140 g/mol) dargestellt.

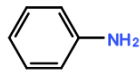
Tabelle 1:
Liste der für das Projekt ausgewählten Amine mit Zuordnung zu einer Amin-
Nummer (= projektinterne Nummer).

Amin Nr.	Amin / Diamin	CAS-Nr.	C	M	R
1	Anilin	62-53-3	2	2	2
2	Cyclohexylamin	108-91-8	-	-	2
3	1,3-Phenylendiamin	108-45-2			
4	1,4-Phenylendiamin	106-50-3			
5	(trans-)1,4-Cyclohexandiamin	2615-25-0			
6	2,6-Dimethylanilin	87-62-7	2	-	-
7	2,4-Dimethylanilin	95-68-1	-	-	-
8	N,N-Dimethylanilin	121-69-7	2	-	-
9	Toluol-2,4-diamin (2,4-TDA)	95-80-7	1B	2	2
10	Toluol-2,6-diamin (2,6-TDA)	823-40-5	-	2	-
11	4-Chloranilin	106-47-8	1B	-	-
12	2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7	1B	-	-
13	1,3-Benzendimethanamin	1477-55-0			
14	3-Chlor-2-methylanilin	87-60-5	1B	-	-
15	4-Chlor-2-methylanilin	95-69-2	1B	2	-
16	2-Phenylimidazolin	936-49-2			
17	1,5-Napthalendiamin	2243-62-1	2	-	-
18	Mischung aus 1,6-Diamino-2,2,4-trimethyl-hexan und 1,6-Diamino-2,4,4-trimethyl-hexan	25513-64-8			
19	1-Amino-3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexan = Isophorondiamin	2855-13-2			
20	Diphenylmethan-4,4'-diamin (4,4'-MDA)	101-77-9	1B	2	-
21	4,4'-Oxydianilin	101-80-4	1B	1B	2
22	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminobiphenyl*	119-93-7	1B	-	-
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	139-65-1	1B	-	-
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	838-88-0			
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	101-14-4	1B	-	-
26	D5-Anilin	4165-61-1			

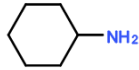
C = kanzerogen, M = mutagen, R = reproduktionstoxisch

* Trivialname: o-Tolidin (leicht zu verwechseln mit o-Toluidin)

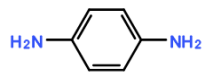
1 Anilin



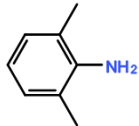
2 Cyclohexylamin



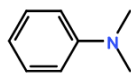
4 1,4-Phenylendiamin



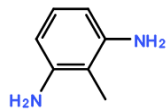
6 2,6-Dimethylanilin



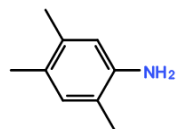
8 N,N-Dimethylanilin



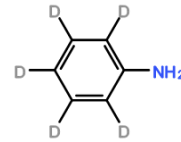
9 2,6-Diaminotoluol = 2,6-TDA



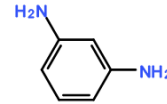
12 2,4,5-Trimethylanilin



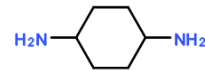
26 D5-Anilin



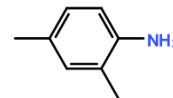
3 1,3-Phenylendiamin



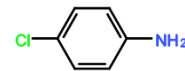
5 1,4-Cyclohexandiamin



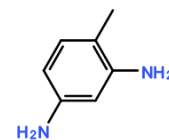
7 2,4-Dimethylanilin



11 4-Chloranilin



10 2,4-Diaminotoluol = 2,4-TDA



13 1,3-Benzendimethanamin

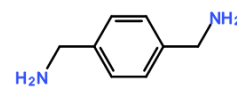
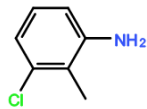
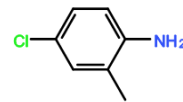


Bild 1:
Strukturformeln der Amine mit molarer Masse < 140 g/mol.

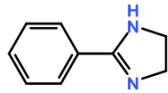
14 3-Chlor-2-methylanilin



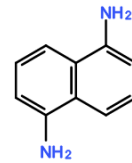
15 4-Chlor-2-methylanilin



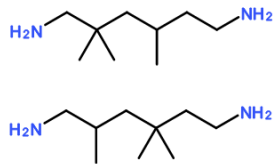
16 2-Phenylimidazolin



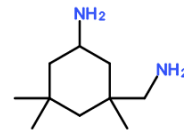
17 1,5-Naphthalendiamin



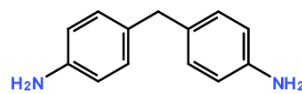
18 Mischung aus 1,6-Di-amino-2,2,4-trimethyl-hexan und 1,6-Diamino-2,4,4-trimethylhexan



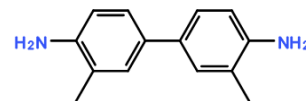
19 1-Amino-3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexan
= Isophorondiamin



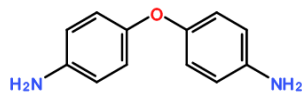
20 Diphenylmethan-4,4'-diamin
= 4,4'-MDA



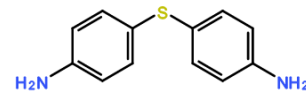
22 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminobiphenyl
= o-Tolidin



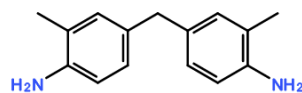
21 4,4'-Oxydianilin



23 4,4'-Diaminodiphenylsulfid



24 3,3'-Dimethyl-4,4'-diamino-diphenylmethan



25 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)

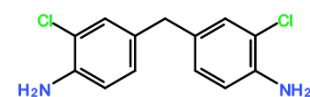


Bild 2:
Strukturformeln der Amine mit molarer Masse >140 g/mol.

3.2 Instrumentelle Analytik

3.2.1 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

Gerät: Xevo® TQ-S, Waters GmbH, Eschborn
Quelle: Zspray™
Ionisierung: ESI+

3.2.2 Flüssigchromatografie (UPLC)

Als stationäre Phase wurde eine Pentafluorphenyl-Phase und als Laufmittel eine Acetonitril-Wasser-Mischung mit jeweils 0,02 Vol.-% Ameisensäure eingesetzt.

Gerät: Acquity UPLC I-Class System, Waters GmbH, Eschborn
Fluss: 0,4 mL/min.
Säule: Acquity UPLC® HSS PFP 1.8 µm; 2.1 x 100 mm;
Waters GmbH, Eschborn
Laufmittel: Acetonitril / Wasser-Mischung
jeweils mit 0,02 Vol.-% Ameisensäure;
isokratisch oder Gradient (Bild 8 auf Seite 23)
Injektionsvol.: 1 bis 100 µL; i. d. R. 5 µL

3.3 Festphasenextraktion (SPE)

3.3.1 SPE mit Umkehrphase (RP)

Für die Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase wurden die Wasserproben basisch eingestellt und anschließend über eine SPE-Kartusche mit Polystyren-Divinylbenzen-Copolymer gezogen (CHROMABOND® HR-P; 6 mL; 500 mg Festphase; 6 ml Kartuschenvolumen; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

3.3.2 SPE mit Kationentauscher (XC)

Die angesäuerten Lösungen bzw. Wasserproben wurden über eine SPE-Kartusche mit Benzolsulfonsäuremodifizierung gezogen (CHROMABOND® HR-XC; pKS < 1; 500 mg Festphase; 6 ml Kartuschenvolumen; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Die Austauschkapazität lag bei 1,0 meq/g x 500 mg = 500 µmol Ionenäquivalente.

3.4 Injektionsharz-Elution mittels Inversem Säulenversuch

3.4.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Der Inverse Säulenversuch (ISV) wird eingesetzt zur Bestimmung der Auswaschung von Stoffen (z. B. Schwermetalle oder Acrylsäure) aus Festkörpern (z. B. Polyacrylat-Dichtmassen) in ein flüssiges Elutionsmittel (z. B. Leitungswasser) [Wag11].

Die Apparatur für den Inversen Säulenversuch (real in Bild 3 und schematisch in Bild 4) besteht aus

- einem 100 L Vorratsgefäß aus Polyethylen (ARICON GmbH; Standard-Dosierbehälter FD-E 100 natur-transparent),
- einer Peristaltikpumpe (Medorex; Schlauchpumpe TBE/200 62-1-6-4,8x1,6; Regelbereich ca.: 8 – 200 U/min.; für Dauerbetrieb geeignet) mit Neoprenschauch (AD 8 mm; ID 4,8 mm),
- zwei Dreiwegehähne aus PTFE (BOLA® 3 Wege-Kegel-Hähne, PTFE),
- Teflon- und Silikonschläuchen (Silikon nur an den Verbindungen)
- einer Elutionssäule, bestehend aus einem Acrylglaszylinder (Höhe: 492 mm, ID: 290 mm, Füllvolumen: 32,5 L) mit Injektionseinlass (in 202 mm Höhe, entspricht 41 % der Gesamthöhe), sowie Polypropylendeckel und –boden.



Bild 3:
Elution des injizierten PUR-Harzes in Inverser Säule. Füllung: Frechener Feinsand, 0 – 1 mm. Injiziertes Harzvolumen: 400 mL.

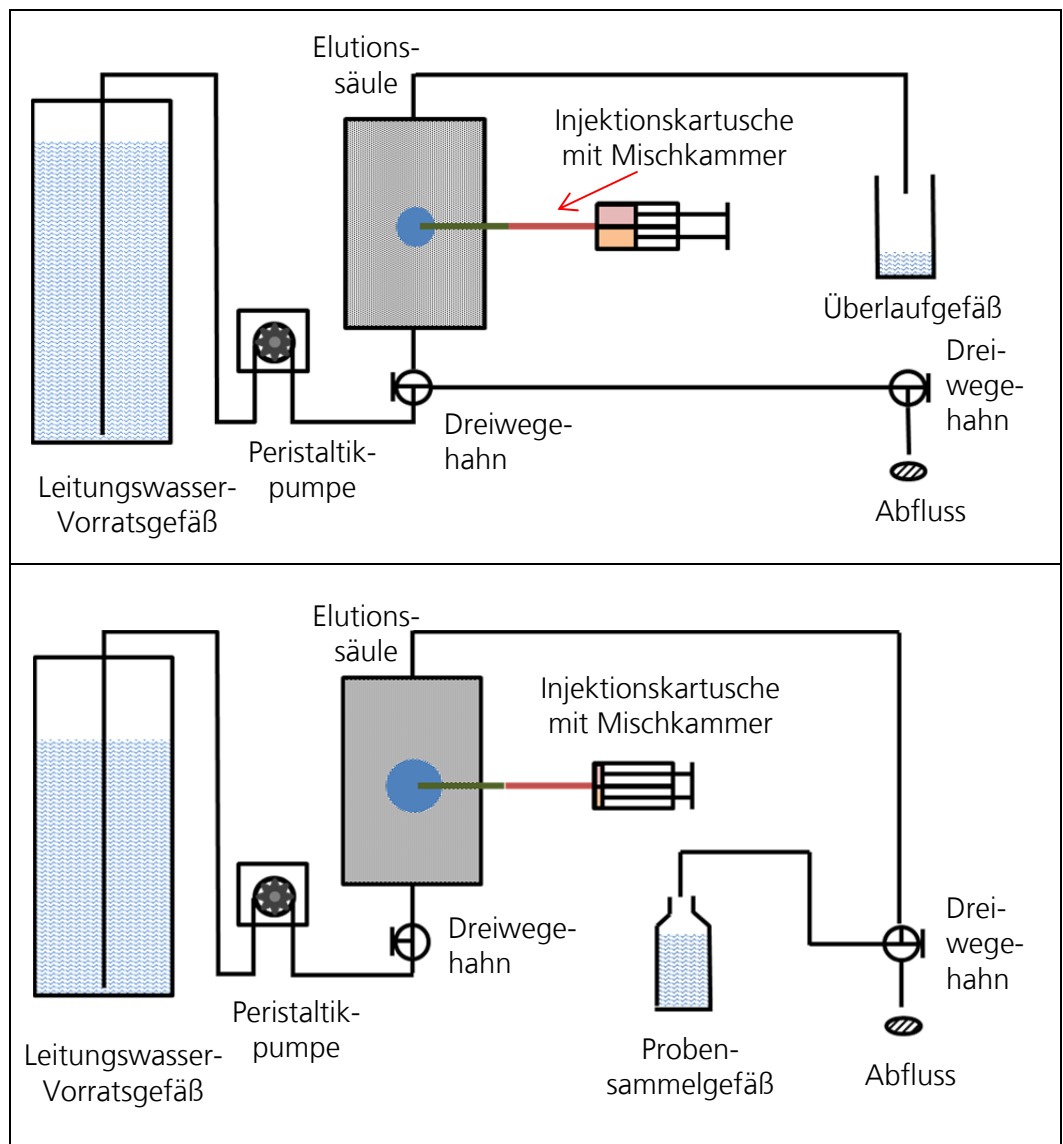


Bild 4:

Inverser Säulenversuch. Oben: Injektion des PUR-Harzes. Unten: Umspülung des Probekörpers mit Leitungswasser und Auffangen des Eluats. Fluss: 3,6 L/h; Fraktionsvolumen: 360 mL (entspricht 6 min). Eine ausführlichere Beschreibung der Versuchsdurchführung ist im Anhang des Abschlussberichtes der ersten Projektphase enthalten [Sch16].

Das Harz wird mit Hilfe von Pressluft (8 bar) und einer Applikationspistole durch eine Mischkammer und ein Einlassrohr direkt in die Mitte der mit Sand gefüllten Elutionssäule injiziert. Die Sandfüllung besteht zu 61,5 Vol-% aus Frechener Feinsand (Korngröße < 1 mm) und zu 38,5 Vol-% aus Leitungswasser. Die eingesetzten 400 mL Harz (Summe aus beiden Komponenten) ergeben einen Probekörper mit einem Volumen von 1,0 L (Harz A). Das Harz A wurde mit einer kurzen (Ziffer 4.4.2) Mischkammer injiziert und untersucht.

Das Füllvolumen der Elutionssäule beträgt 32,5 L. Neben 52 kg Quarzsand, das entspricht 20 L Sand (Dichte: 2,6 kg/L), enthält die beladene Säule demnach 12,5 L Wasser. Das Gemisch hat eine Dichte von 1,98 kg/L.

Von den 12,5 L Wasser sind etwa 59 % bzw. 7,4 L oberhalb des Injektions-einlasses. Nach der Injektion des Harzes (0,4 L x ½) verbleiben etwa 7,2 L Wasser oberhalb des Injektionseinlasses. Die Elutionsdauer betrug 3,6 h, der Volumenstrom 3,6 L/h. Die berechnete Totzeit liegt damit bei 2,0 h.

Die Zeitauflösung beträgt 6,0 min., die Auflösung bezüglich des Durchflussvolumens 0,36 L. Eine Elutionsfraktion entspricht räumlich dem Wasservolumen in einer gepackten Säulenschicht mit 1,4 cm Höhe (Wassergehalt: 38,5 Vol.-%).

Zur chemischen Stabilisierung der tendenziell oxidationsempfindlichen aromatischen Amine [Ame13] [Azn09] wurden die Elutionsfraktionen nach dem Sammeln mit 180 µL 85%ige Phosphorsäure pro 0,36 Liter angesäuert.

Die Entwicklung der Festphasenextraktion erfolgte unter anderem mit Eluaten aus den Inversen Säulenversuchen (ISV-Eluate) der ersten Projektphase vom November 2015. Die Gewinnung frischer matrixbelasteter ISV-Eluate (Februar 2018) erfolgte wieder mit Hilfe eines Inversen Säulenversuchs. Den ISV-Eluaten wurden Amine zudosiert, anschließend wurde die Mischung einer Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion unterzogen. Die ISV-Eluate sowie die SPE-Eluate wurden mittels Ultrahochleistungschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) auf das Vorkommen der 26 organischen Amine untersucht.

3.4.2 Untersuchungsumfang Polyurethanharze

Es wurde ein niedrigviskoses Duromerharz auf Polyurethanbasis mit kurzer Reaktionszeit und hoher Druck- und Biegezugfestigkeit eingesetzt. Neben 4,4'-MDA als Hauptbestandteil enthält es Polyetherpolyol auf Aminbasis und lineares Polyetherpolyol. Das Injektionsharz schäumt in Kontakt mit Wasser begrenzt auf. In Bild 5 ist die verwendete Mischkammer zu sehen. Das eingesetzte PUR-Injektionsharz entspricht dem „Harz A“ aus der ersten Projektphase [Sch16].

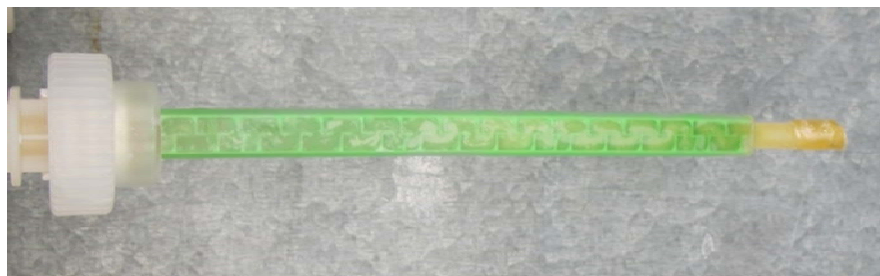


Bild 5:
Eingesetzte „kurze“ Mischkammer.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden sind die analytspezifischen LC-MS-Parameter mit den zugehörigen Nachweisgrenzen (ab S. 19), sowie Ergebnisse zur Aufreinigungsmethode (ab S. 43), zu den Harz-Elutionsversuchen (ab S. 64) und zu den Matrixeffekten (ab S. 42), aufgeführt.

4.1 Instrumentelle Analytik

4.1.1 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

In Tabelle 2 sind die für die Tandemmassenspektrometrie verwendeten Massenübergänge aufgelistet. Die chlorhaltigen Amine spalten ein Chlor-Radikal oder HCl ab und haben daher sehr charakteristische Massenübergänge und ein geringes Grundrauschen. Auch die Abspaltung von Ammoniak (NH_3) oder Anilin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$) bzw. entsprechender Derivate ist sehr selektiv. Das stärkste Grundrauschen und die häufigsten Interferenzen treten bei Methylradikal-Abspaltungen auf (Amin 8).

Tabelle 2:
Massenübergänge der 26 untersuchten Amine.

Amin Nr.	Amin	M 1	M 2	ESI [V]	Col. [eV]	M3	ESI [V]	Col. [eV]
1	Anilin	94	77	50	14	51	50	16
2	Cyclohexylamin	100	83	25	10	55	25	12
3	1,3-Phenylendiamin	109	92	25	12	66	25	15
4	1,4-Phenylendiamin	109	92	25	12	66	25	15
5	1,4-Cyclohexandiamin	115	98	25	12	--	--	--
6	2,6-Dimethylanilin	122	105	30	16	107	30	16
7	2,4-Dimethylanilin	122	105	30	16	107	30	16
8	N,N-Dimethylanilin	122	107	30	16	--	--	--
9	2,6-TDA	123	106	44	20	108	44	20
10	2,4-TDA	123	106	44	20	108	44	20
11	4-Chloranilin	128	93	22	18	111	22	16
12	2,4,5-Trimethylanilin	136	77	22	28	121	22	18
13	1,3-Benzendimethanamin	137	120	25	12	--	--	--
14	3-Chlor-2-methylanilin	142	107	40	20	125	40	18
15	4-Chlor-2-methylanilin	142	107	40	20	125	40	18
16	2-Phenylimidazolin	147	44	25	18	--	--	--
17	1,5-Naphthalendiamin	159	115	50	26	142	50	20
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	159	142	25	12	--	--	--
19	Isophorondiamin	171	154	25	12	--	--	--
20	4,4'-MDA	199	106	30	28	182	30	22
21	4,4'-Oxydianilin	201	80	100	20	108	100	32
22	o-Tolidin	213	181	40	12	197	40	12
23	4,4'-Diamino-diphenylsulfid	217	124	60	18	200	60	10
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	227	120	40	24	--	--	--
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	267	140	56	22	231	56	12
26	d5-Anilin	99	82	50	14	56	50	16

M 1 = M + H⁺

M 2 = für Quantifizierung

M 3 = für Qualifizierung

107, 121 = höchster Peak, aber wenig selektiv (Abspaltung einer Methylgruppe)

Literatur: [Hai14] [Sch11] [Joh10] [Gar10] [Sah09] [Azn09] [Mor05] [Sut05]

4.1.2 Flüssigchromatografie (UPLC)

Für die Optimierung der chromatographischen Methode wurden zunächst Daten zu Retentionszeiten in Abhängigkeit von der Laufmittelzusammensetzung ermittelt und ausgewertet (Bild 7).

Die Analyse der gesammelten Daten ergibt, dass für die ausgewählten 26 Amine bei Verwendung einer isokratischen UPLC-Methode ein Acetonitrilanteil von 34,9 % zugleich zu einer guten Trennung und zu einer kurzen Dauer der Methode führt.

In Bild 6 sind beispielhaft die Laufzeiten für 6 Amine in Abhängigkeit von der Laufmittelzusammensetzung dargestellt.

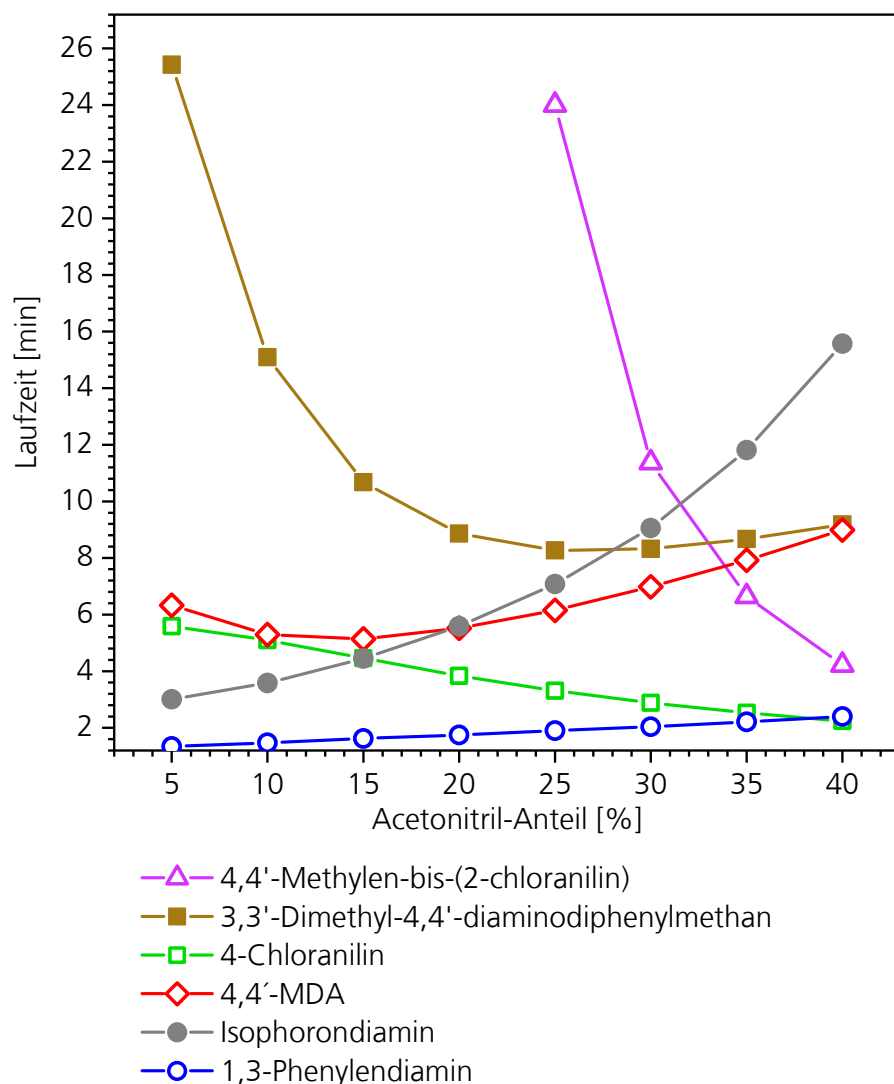


Bild 6:
Chromatographische Eigenschaften von Aminen mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften am Beispiel von 6 Aminen.

4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) (25) ist ein Beispiel für ein sehr hydrophobes Amin. Mit zunehmendem Acetonitrilanteil verkürzt sich die Laufzeit. Erst bei einem hohen Acetonitrilanteil (> 30 %) werden ausreichend kurze Laufzeiten erhalten. Isophorondiamin (19) weist ein gegenläufiges Verhalten auf: je höher der Acetonitrilanteil, desto länger die Laufzeit. Die kleineren Moleküle 4-Chloranilin (11) und 1,3-Phenylendiamin (3) weisen bei allen Mischungsverhältnissen eine kurze Laufzeit auf. 1,3-Phenylendiamin ist gut wasserlöslich (Kurve steigt an), 4-Chloranilin dagegen hydrophob (Kurve fällt ab). Sowohl 4,4'-MDA (20) als auch 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminophenylmethan (24) zeigen ein Minimum bei etwa 15 % bzw. 30 % Acetonitrilanteil und damit amphoterer Charakter. Auch bei diesen beiden Aminen ist das Verhalten bezüglich des Acetonitrilanteils quantitativ gegenläufig (Amin 24 eher hydrophob, 4,4'-MDA eher hydrophil). Diese sechs Beispiele sowie die Verläufe aller 26 Amine in Bild 7 zeigen die große Bandbreite an physikalisch-chemischen Eigenschaften der Amine.

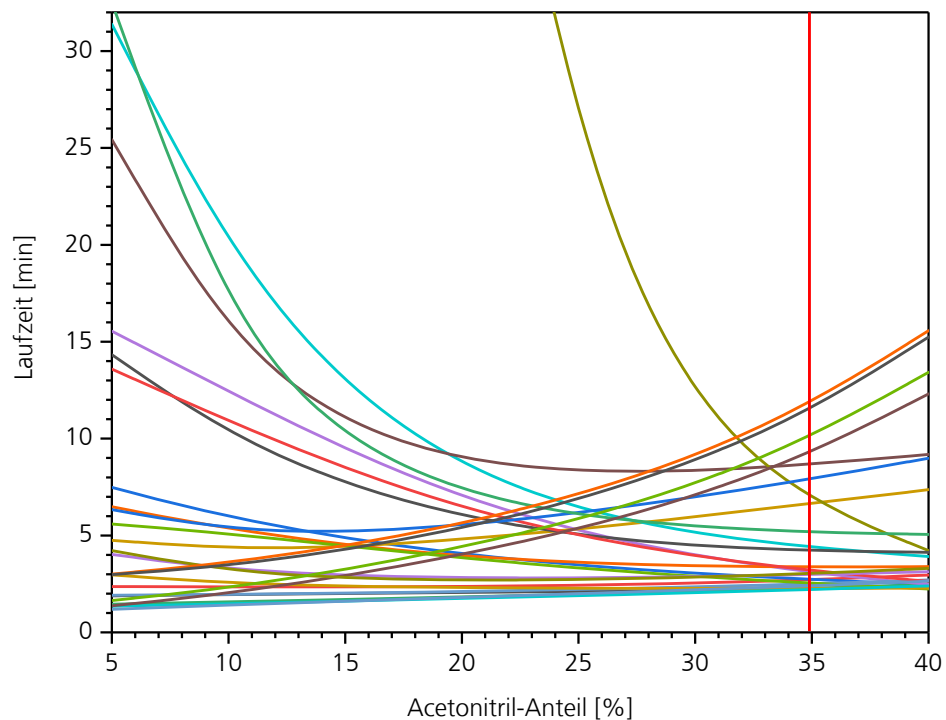


Bild 7:
Einfluss der Laufmittelzusammensetzung auf die Laufzeit der 26 untersuchten Amine (ohne Zuordnung zu den einzelnen Aminen). Die rote Linie markiert die Laufmittelzusammensetzung der isokratischen Methode.

Die gesammelten Daten wurden außerdem eingesetzt, um mit MS Excel verschiedene Gradienten zu simulieren und den Gradienten mit den optimalen Trenneigenschaften zu ermitteln. In Bild 8 ist der Gradient dargestellt, der zunächst in der Simulation und anschließend in der Praxis das beste Trennergebnis zeigte. Die gemessenen Laufzeiten stimmen meist sehr genau mit den simulierten Laufzeiten überein.

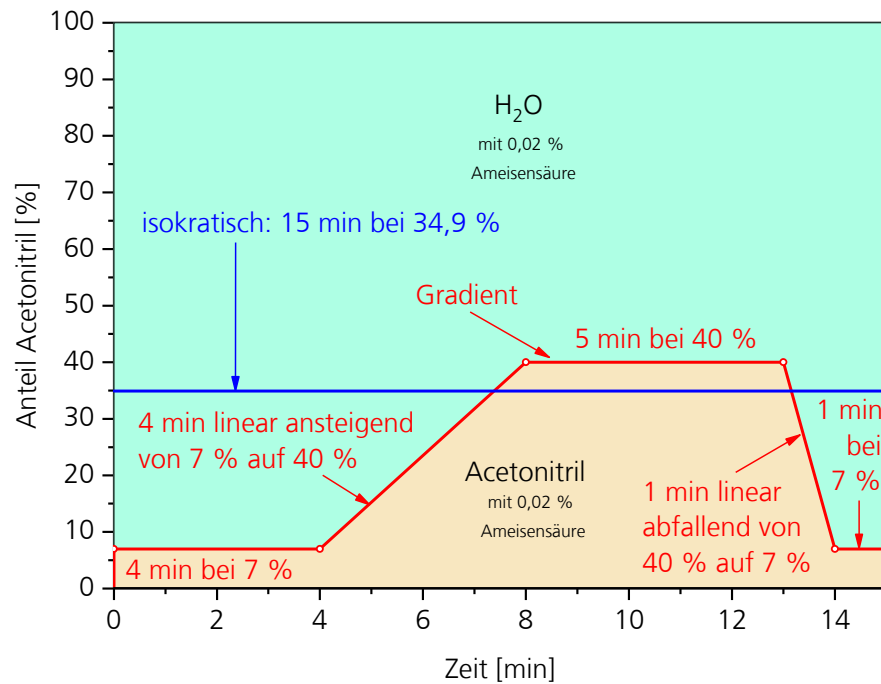


Bild 8:
Acetonitril / Wasser-Gradient. Beide Komponenten enthalten 0,02 Vol.-% Ameisensäure.

Bei der Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses für die isokratische Methode sowie der optimalen Gradienten-Methode sind insbesondere Isomere (siehe Bild 9) und Amine mit gleichen oder ähnlichen Molekülmassen zu berücksichtigen (wie z. B. 2,4,5-Trimethylanilin (12) und 1,3-Benzendimethanamin (13) sowie 1,5-Naphthalendiamin (17) und die Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung (18)).

Auch auf MS-Interferenzen durch Verunreinigungen der Chemikalien, die für die Kalibrierung eingesetzt werden, muss geachtet werden. Zum Beispiel kann Cyclohexylamin (2) auch Anilin (1) als Verunreinigung enthalten.

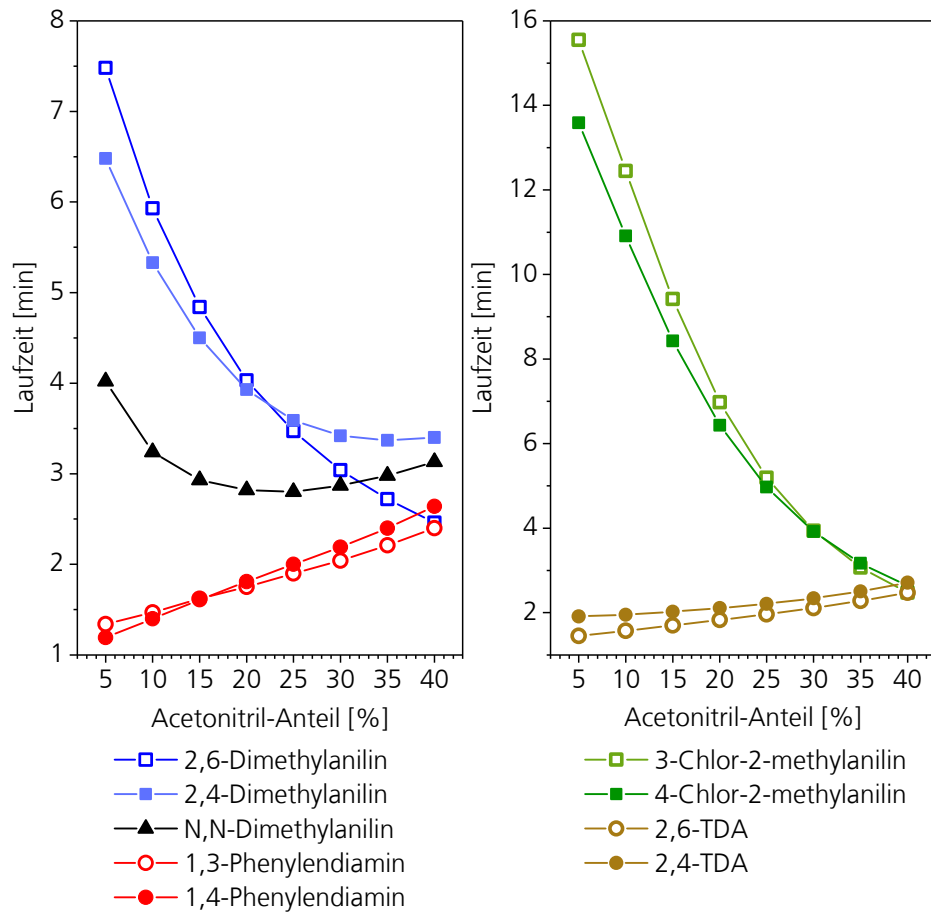


Bild 9:
Chromatographische Eigenschaften der untersuchten Amin-Isomere.

In Tabelle 3 sind die Laufzeiten der 26 untersuchten Amine für die isokratische Methode aufgeführt. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Bild 10 dargestellt.

Tabelle 4 enthält die Laufzeiten der 26 untersuchten Amine für die Gradienten-Methode. Bild 11 zeigt die zugehörigen Chromatogramme.

Tabelle 3:
 Laufzeiten der 26 untersuchten Amine mit isokratischer Methode
 (s. Ziffer 3.2.1).

Amin Nr.	Amin / Diamin	RT [min]	von* [min]	bis* [min]	Breite* [min]
1	Anilin	2,25	2,18	2,32	0,14
2	Cyclohexylamin	2,70	2,61	2,79	0,18
3	1,3-Phenylendiamin &	2,19	2,10	2,28	0,18
4	1,4-Phenylendiamin &	2,38	2,30	2,48	0,18
5	1,4-Cyclohexandiamin	8,8	8,5	9,1	0,6
6	2,6-Dimethylanilin &	2,74	2,66	2,84	0,18
7	2,4-Dimethylanilin &	3,37	3,27	3,45	0,18
8	N,N-Dimethylanilin &	2,96	2,84	3,08	0,24
9	2,6-TDA &	2,27	2,19	2,35	0,16
10	2,4-TDA &	2,49	2,39	2,59	0,20
11	4-Chloranilin	2,55	2,43	2,65	0,22
12	2,4,5-Trimethylanilin	4,20	4,08	4,32	0,24
13	1,3-Benzendimethanamin	9,7	9,2	10,0	0,8
14	3-Chlor-2-methylanilin #	3,12	3,03	3,16 #	0,13 #
15	4-Chlor-2-methylanilin #	3,21	3,16 #	3,29	0,13 #
16	2-Phenylimidazolin	3,01	2,90	3,12	0,12
17	1,5-Naphthalendiamin	2,29	2,23	2,37	0,14
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	11,0	10,6	11,4	0,8
19	Isophorondiamin	11,3	10,8	11,8	1,0
20	4,4'-MDA	7,8	7,5	8,0	0,5
21	4,4'-Oxydianilin	6,6	6,3	6,8	0,5
22	o-Tolidin	5,2	5,0	5,4	0,4
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	4,42	4,28	4,56	0,28
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	8,6	8,2	9,0	0,8
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	6,82	6,67	6,97	0,30
26	d5-Anilin	2,26	2,17	2,35	0,18

* an der Basis

& Basislinientrennung

keine Basislinientrennung

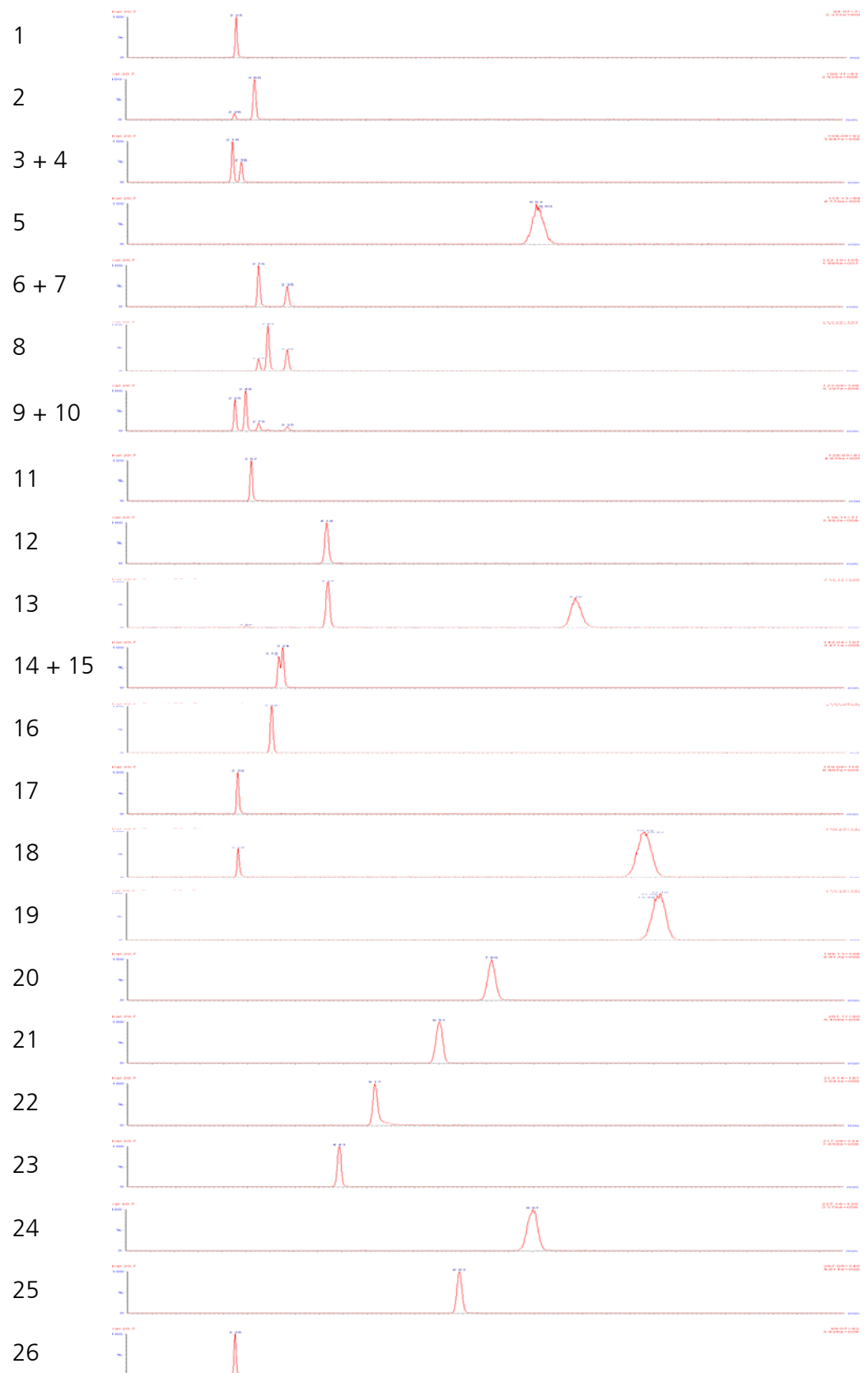


Bild 10:
Chromatogramme bei isokratischer Methode.

Tabelle 4:
 Laufzeiten der 26 untersuchten Amine bei der Gradienten-Methode
 (s. Ziffer 3.2.1).

Amin Nr.	Amin / Diamin	RT [min]	von* [min]	bis* [min]	Breite* [min]
1	Anilin	2,01	1,96	2,05	0,09
2	Cyclohexylamin	2,47	2,41	2,55	0,14
3	1,3-Phenylendiamin #	1,45	1,40 #	1,51	0,11 #
4	1,4-Phenylendiamin #	1,33	1,28	1,40 #	0,12 #
5	1,4-Cyclohexandiamin	1,66	1,61	1,74	0,13
6	2,6-Dimethylanilin &	6,12	6,03	6,20	0,17
7	2,4-Dimethylanilin &	6,54	6,43	6,64	0,21
8	N,N-Dimethylanilin &	3,76	3,65	3,90	0,25
9	2,6-TDA &	1,58	1,52	1,63	0,11
10	2,4-TDA &	2,01	1,95	2,08	0,13
11	4-Chloranilin	5,51	5,43	5,59	0,16
12	2,4,5-Trimethylanilin	8,55	8,47	8,62	0,15
13	1,3-Benzendimethanamin	2,01	1,92	2,08	0,16
14	3-Chlor-2-methylanilin &	8,58	8,50	8,63	0,13
15	4-Chlor-2-methylanilin &	8,37	8,30	8,44	0,14
16	2-Phenylimidazolin	3,86	3,76	3,98	0,22
17	1,5-Napthalendiamin	2,9	2,8	3,0	0,2
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	3,34	3,20	3,48	0,28
19	Isophorondiamin	3,48	3,30	3,62	0,32
20	4,4'-MDA	6,13	6,00	6,25	0,25
21	4,4'-Oxydianilin	4,93	4,77	5,05	0,28
22	o-Tolidin	9,90	9,85	10,05	0,20
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	9,72	9,65	9,80	0,15
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	12,07	11,75	12,25	0,5
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	11,66	11,58	11,78	0,20
26	d5-Anilin	1,99	1,91	2,03	0,12

* an der Basis

& Basislinientrennung

keine Basislinientrennung

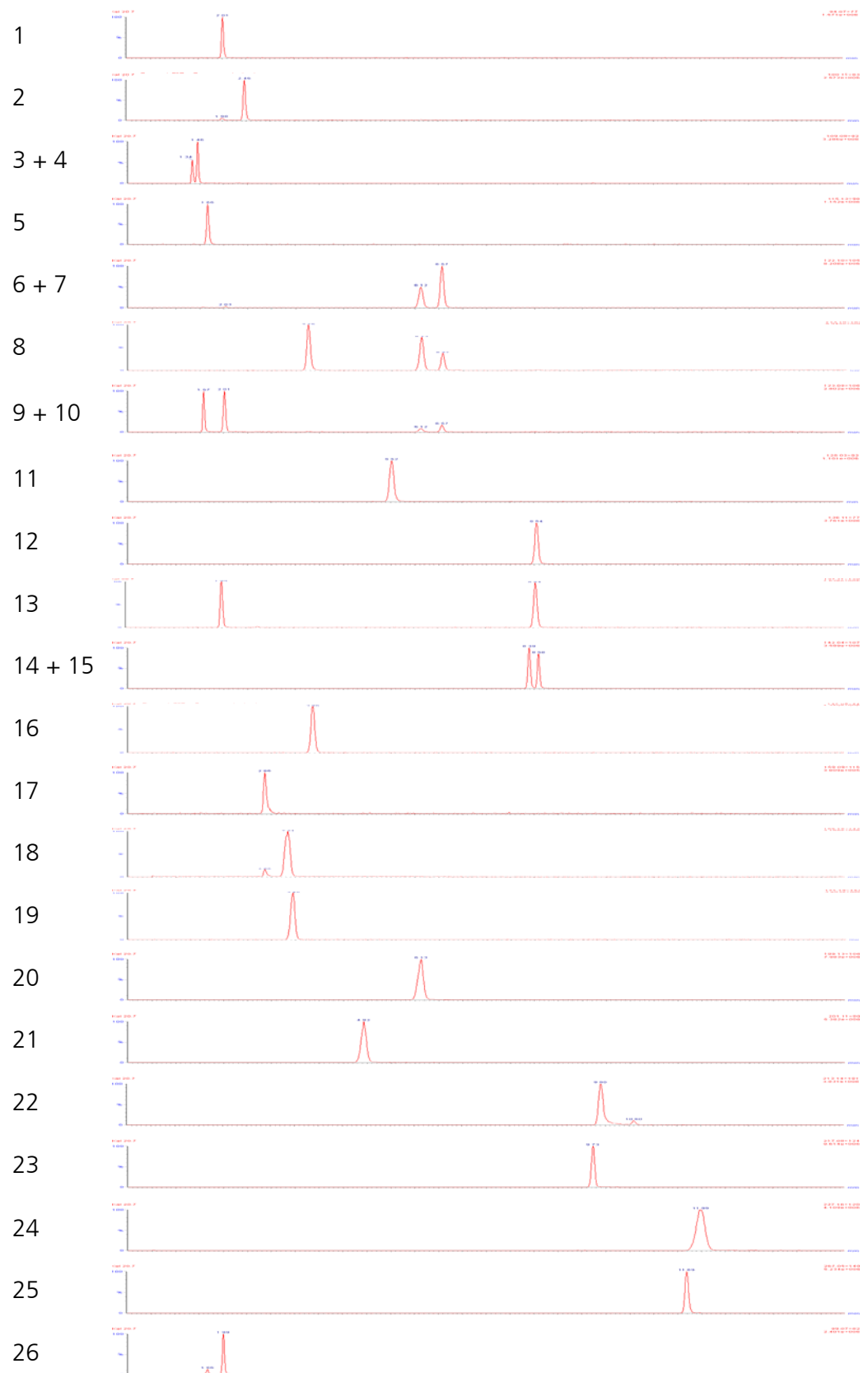
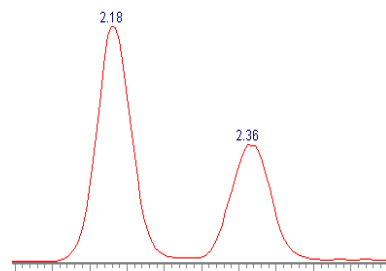


Bild 11:
Chromatogramme bei Gradienten-Methode.

In Bild 12 bis Bild 16 sind Chromatogramm-Ausschnitte für die Amin-Isomeren gezeigt. Bei der Gradienten-Methode erfolgt die Trennung der Phenylldiamin-Isomere (Bild 12) nicht ganz vollständig, dafür sind die Peaks der Chlor-2-methylanilin-Isomere basisliniengetreunt (Bild 16). Die Dimethylanilin-Isomere (Bild 14) sowie die Diaminotoluol-Isomere (Bild 13) werden mit beiden Methoden chromatographisch gut getrennt (zusammen in Bild 15).

isokratisch



Gradient

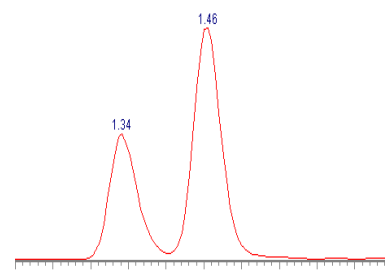
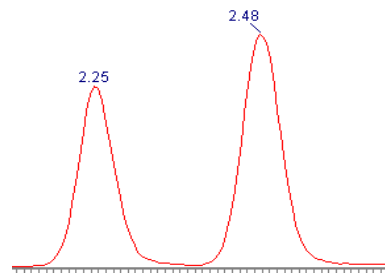


Bild 12:
Chromatographische Trennung von 1,3-Phenylendiamin und 1,4-Phenylendiamin.

isokratisch



Gradient

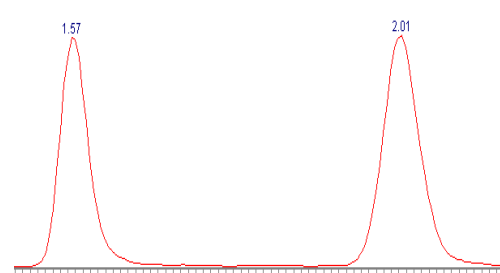
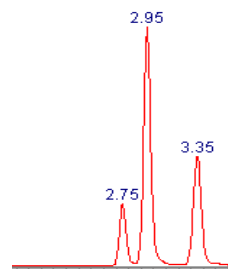


Bild 13:
Chromatographische Trennung von 2,6-TDA und 2,4-TDA.

isokratisch



Gradient

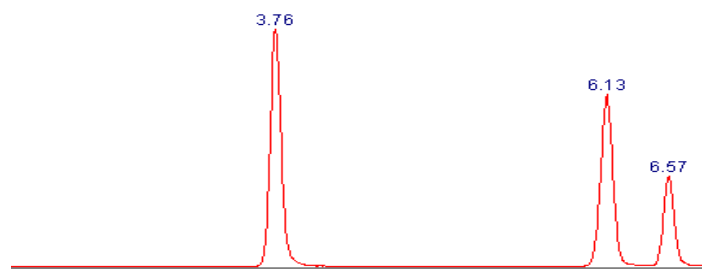


Bild 14:
Chromatographische Trennung von 2,6-Dimethylanilin (2,75/6,57), 2,4-Dimethylanilin (3,35/6,13) und N,N-Dimethylanilin (2,95/3,76). Massenübergang 122 > 107.

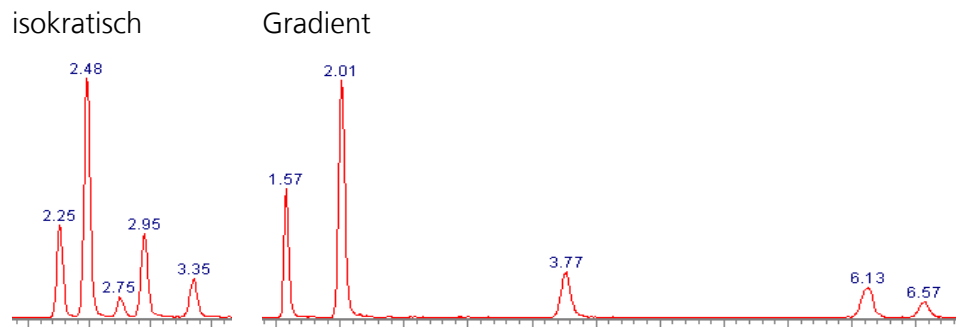


Bild 15:
Chromatographische Trennung von 2,6-TDA (2,25/2,01), 2,4-TDA (2,48/1,57), 2,6-Dimethylanilin (2,75/6,57), 2,4-Dimethylanilin (3,35/6,13) und N,N-Dimethylanilin (2,95/3,77). Massenübergang 123 > 108.

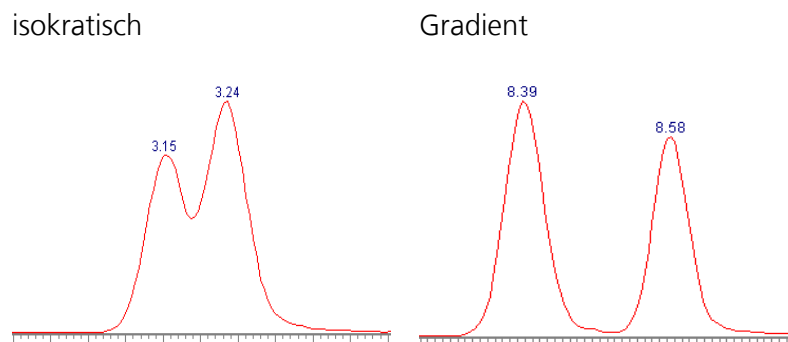


Bild 16:
Chromatographische Trennung von 3-Chlor-2-methylanilin und 4-Chlor-2-methylanilin.

Die Empfindlichkeit des UPLC-MS/MS-Verfahrens ist für die untersuchten 26 Amine sehr unterschiedlich. Die Steigung der Kalibriergeraden liegt für die isokratische Methode zwischen 10.000 counts/pg für 4,4'-MDA und 50 counts/pg für 1,4-Cyclohexandiamin (vgl. Bild 17 und Bild 18). Die geringste Steigung ist also um den Faktor 200 kleiner als die höchste Steigung.

Bei keinem Amin ist die Gradienten-Methode wesentlich empfindlicher als die isokratische Methode. Für 9 Amine sind beide Methoden ähnlich empfindlich (Abweichung < 20 %). Für 14 Amine ist die isokratische Methode diejenige mit der höheren Steigung. Bei 12 Aminen beträgt der Unterschied über 60 % (Bild 18).

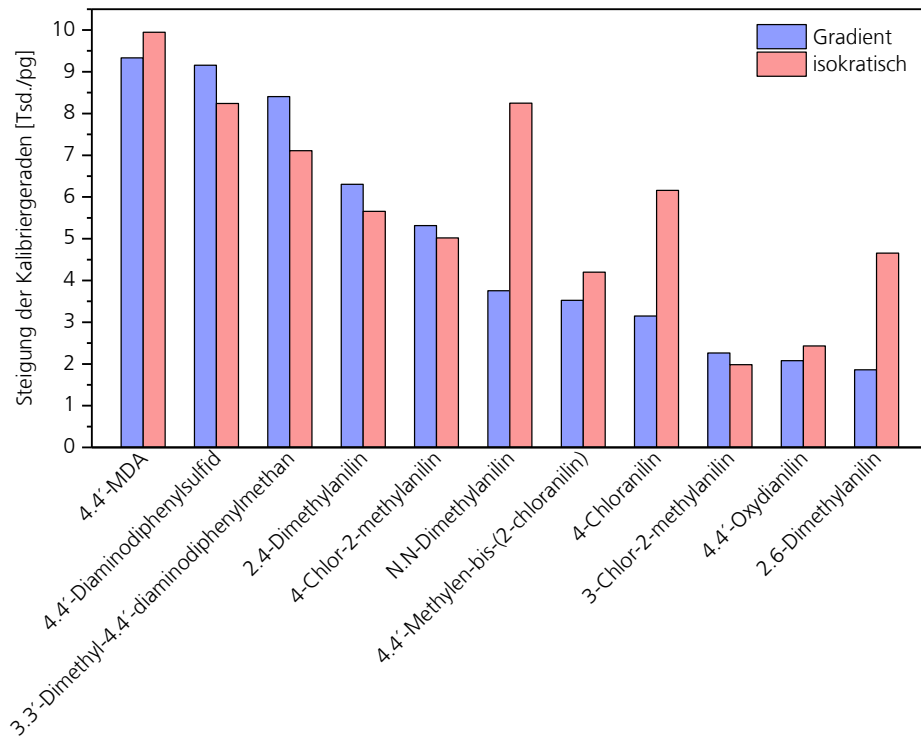


Bild 17:
Vergleich der Steigung der Kalibriergerade bei Gradienten-Methode und isokratischer Methode für 11 stabile Amine mit hoher Empfindlichkeit absteigend sortiert nach Gradienten-Methode.

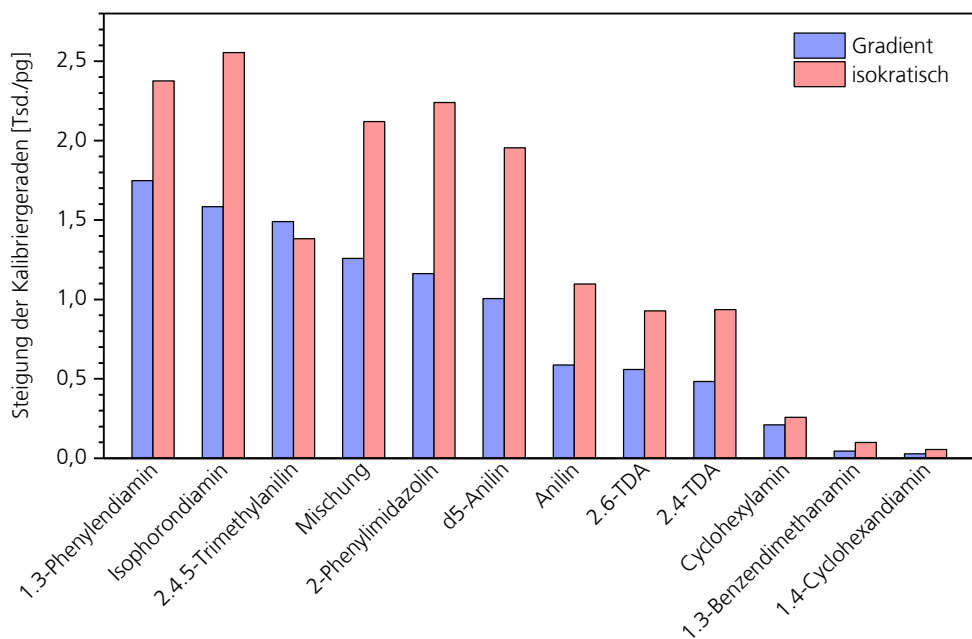


Bild 18:
Vergleich der Steigung der Kalibriergerade bei Gradienten-Methode und isokratischer Methode für 11 stabile Amine mit geringer Empfindlichkeit absteigend sortiert nach Gradienten-Methode.

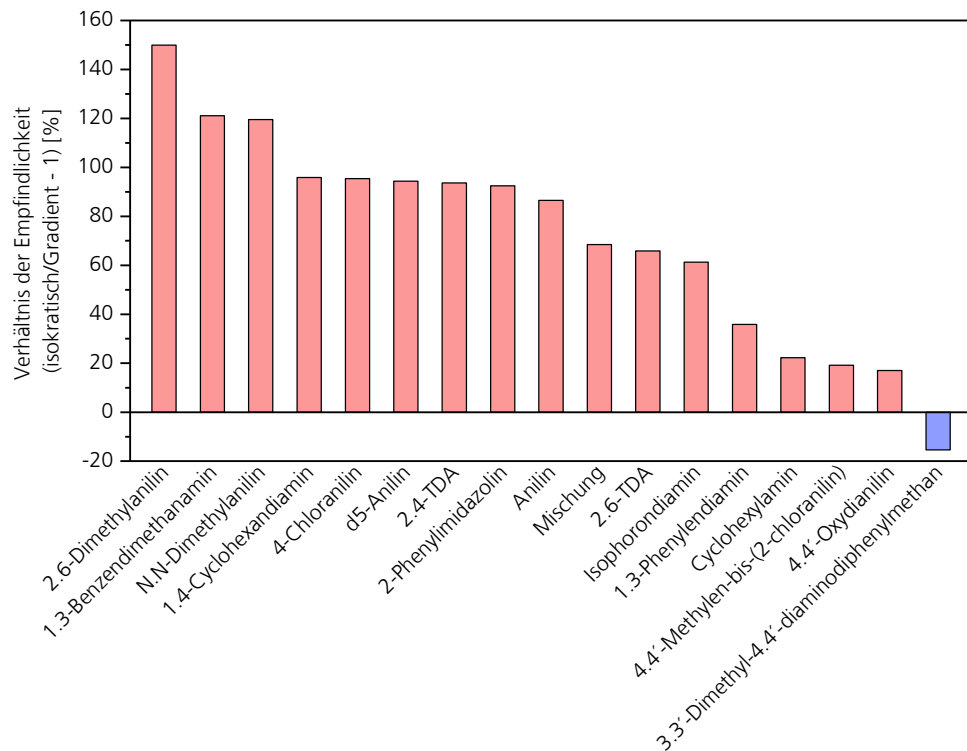


Bild 19:
Verhältnis der Empfindlichkeit der isokratischen Methode zur Gradienten-Methode $\{y = (m_{\text{isokr.}} / m_{\text{Grad.}} - 1) \times 100\}$. Gezeigt sind nur Abweichungen über 15 %.

Die Dauer beider Methoden beträgt 15 min.. Der Vorteil der isokratischen Methode ist die höhere Empfindlichkeit, ihr Nachteil die ungenügende Trennung der Chlor-2-methylanilin-Isomere. Ein Vorteil der Gradienten-Methode ist, dass hochpolare Störkomponenten zu Beginn des Chromatographie-Laufs bei einem Wassergehalt von 93 % schnell durch die Säule durchgespült werden. Ein weiterer Vorteil sind die schmalere Banden und die gleichmäßigere Form der Amin-Peaks. Ein zusätzlicher Vorteil ist die optimierte Trennung der Isomere. Insbesondere für die Basislinientrennung von 3-Chlor-2-methylanilin und 4-Chlor-2-methylanilin ist die Gradientenmethode vorzuziehen. Daher ist im Einzelfall abzuwägen und ggf. zu testen, welche Methode die besseren Ergebnisse liefert.

4.1.3 Kalibrierung, Stabilität und Signal-Rausch-Verhältnis

Das Lösungsmittel der Kalibrierlösung = „LSM-Mischung B“ entspricht dem Laufmittel der isokratischen UPLC-Methode. Es besteht aus einer Mischung aus Wasser, Acetonitril und Ameisensäure:

LSM-Mischung B:

160 mL Acetonitril / 300 mL Reinstwasser / 90 µL Ameisensäure
=> ergibt ca. 460 mL zum Verdünnen bei den Verdünnungsreihen

Für das Ansetzen der Urlösung wird ein höherer Gehalt an Ameisensäure benötigt, um die basischen Amine zu neutralisieren:

LSM-Mischung A:

300 mL Acetonitril / 560 mL Reinstwasser / 800 µL Ameisensäure
=> ergibt ca. 860 mL zum Ansetzen der Urösungen

Die Steigung m (in [counts/(µg/L)]) der Kalibriergeraden wird erhalten durch Multiplikation der spezifischen Geräteempfindlichkeit m' (in [counts/pg]) mit dem Injektionsvolumen $V_{\text{Injektion}}$ (in [µL]):

$$m = m' \times V_{\text{Injektion}}$$

Die Steigung m der Kalibriergeraden in [counts/(µg/L)] ist ein Maß für die Verfahrensempfindlichkeit. Neben einer hohen Steigung m ist aber auch ein geringes Grundrauschen Voraussetzung für ein nachweisstarkes Messverfahren. Im Rahmen der Phase II des Forschungsprojektes wurden Injektionsvolumina von 5 µL oder 1 µL eingesetzt. Eine Erhöhung auf 100 µL, also um den Faktor 20, ist möglich, wenn die Probe keinen Matrixeffekt aufweist. In Tabelle 10 auf Seite 41 sind die Amin-Konzentrationen aufgeführt, bei denen das Signal-Rausch-Verhältnis bei einer Injektion von 5 µL über 3 liegt (etwa bei 5).

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit des Messverfahrens hinsichtlich der einzelnen Amine sind die Amin-Konzentrationen in den Kalibrierstandards dahingehend angepasst, dass die geringste Konzentration einen Peak mit Signal-Rausch-Verhältnis von etwa 5 erreicht. Das Konzentrationsverhältnis der Amine ist in Tabelle 5 in der Spalte „Faktor“ aufgelistet.

In Tabelle 6 (oberer Konz.-Bereich) und Tabelle 8 (unterer Konz.-Bereich) sind die Steigungen der Ursprungsgeraden für die 26 Amine für 3 Zeitpunkte aufgelistet. Die erste UPLC-MS/MS-Messung der Kalibrierstandardlösungen erfolgte 5 h (unterer Konz.-Bereich) bzw. 8 h (oberer Konz.-Bereich) nach deren Herstellung. Eine zweite 31 bzw. 34 h nach deren Herstellung und eine dritte 72 bzw. 75 h danach.

Im oberen Konzentrationsbereich (entsprechend Tabelle 5) bleiben die Geradensteigungen bei allen drei Messungen (8 h, 34 h und 75 h) für 12 Amine bis auf eine Schwankung von maximal 10 % konstant. Bei weiteren 6 Aminen bleibt die Schwankung unter 25 %.

Für drei Amine bricht im oberen Konzentrationsbereich die Geradensteigung im Intervall von Messung A (8 h) nach Messung B (34 h) stark ein: Bei Anilin (1), d5-Anilin (26) und Cyclohexylamin (2) sinkt die Geradensteigung um 52 %, 38 % bzw. 34 % (rote Felder in Tabelle 6). Bei der Messung C, die 41 h nach Messung B erfolgte, ist die Geradensteigung um weitere 21 %, 18 % bzw. 10 % reduziert. Diese starke und kontinuierliche Abnahme der Geradensteigung spricht für eine kontinuierliche Degradierung der Analyten.

Die Geradensteigung nimmt bei 1,5-Naphthalendiamin zunächst um 68 % zu, fällt jedoch von Messung B nach Messung C wieder um 30 % ab. Dieses Verhalten spricht entweder für eine Instabilität des analytischen Messverfahrens mit großen Schwankungen oder für einen gegenläufigen Effekt: Die

Empfindlichkeit des Messverfahrens nimmt von Messung A nach Messung B zu während der Analyt zwischen Messung B und Messung C zunehmend degradiert.

Ein ähnliches Verhalten wie bei 1,5-Naphthalendiamin, jedoch weniger deutlich in der Ausprägung, ist auch bei o-Tolidin und N,N-Dimethylanilin zu beobachten: Zunächst steigt die Geradensteigung um 32 % bzw. 25 %, dann fällt sie um 6 % bzw. 19 % ab.

Bei Isophorondiamin und der Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung steigt die Geradensteigung um bis zu 28 % bzw. 29 % an.

Im oberen Messbereich liegt das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 24 der 26 Amine oberhalb von 0,990 (Tabelle 7; Messung B, bei instabilen Aminen Messung A). Für die Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,988 und für Cyclohexylamin von 0,963 erhalten. Für 4,4'-MDA und 4 weitere Amine liegt das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 0,999.

Bei Isophorondiamin und in geringerem Ausmaß bei 4,4'-Diaminodiphenylsulfid treten Verschleppungseffekte auf, die zu einem positiven Offset führen (Tabelle 7). Für Isophorondiamin entspricht die Verschiebung der Gerade nach oben einer Aminmasse von 39 pg, bei 4,4'-Diaminodiphenylsulfid einer Aminmasse von 1 pg.

Zwei Amine weisen bei Messung A, also bereits 8 h nach Herstellung der Kalibrierlösungen, einen negativen Offset auf: Die Verschiebung der Gerade nach unten entspricht einem Verlust an Aminmasse von 24 pg bei 1,4-Phenylendiamin und von 39 pg bei 1,5-Naphthalendiamin. Ein negativer Offset bedeutet, dass in allen 10 Vials der gleiche absolute Verlust an Analyt auftritt. Dieser Effekt kann erklärt werden durch eine Adsorption an die Gefäßwände mit einer begrenzten Belegung (z. B. Langmuir-Isotherme) oder durch eine Oxidation durch gelösten Sauerstoff, wobei die Sauerstoffkonzentration in der Kalibrierlösung in allen Vials gleich ist und den Abbau limitiert.

Die Prozesse, die zu einem negativen Offset führen (bei 1,4-Phenylendiamin und 1,5-Naphthalendiamin), sind analytisch gut zu unterscheiden von den Prozessen, die zu einer geringeren Geradensteigung führen (bei Anilin, d5-Anilin und Cyclohexylamin). Eine Abnahme der Geradensteigung entspricht einem Abbau proportional zur Analyt-Konzentration. Während bei einem negativen Offset die Konzentration an Sauerstoff geschwindigkeitsbestimmend ist, ist bei einer Verringerung der Geradensteigung die Analyt-Konzentration geschwindigkeitsbestimmend.

Sämtliche Effekte, die bei den Messreihen im oberen Konzentrationsbereich beobachtet werden, treten verstärkt im unteren Konzentrationsbereich (siehe Tabelle 5) auf.

Bei Anilin, d5-Anilin, Cyclohexylamin sowie bei 1,4-Phenylendiamin und 1,5-Naphthalendiamin treten starke Degradationseffekte auf.

Die Geradensteigung verringert sich bei Anilin bzw. d5-Anilin um 67 % und 28 % bzw. um 56 % und 32 % bei den Messungen B (31 h) und C (72 h) (Tabelle 8). Bei Cyclohexylamin ist dieser Effekt mit -39 % und -16 % etwas schwächer ausgeprägt.

1,4-Phenylendiamin und 1,5-Naphthalendiamin weisen bereits in Messung A, also 5 h nach Herstellung der Kalibrierlösungen, einen negativen Offset auf, der 9 pg bzw. 12 pg entspricht (Tabelle 9). Die Abnahme der Geradensteigung (einer Ursprungsgerade) zwischen Messung B und Messung C beträgt 77 % bzw. 74 % (Tabelle 8). Die Daten weisen auf eine hohe Instabilität der Analyten hin. Messungen im unteren Konzentrationsbereich sind bei diesen Analyten nicht reproduzierbar.

Bei Isophorondiamin und 4,4'-Diaminodiphenylsulfid treten auch im unteren Konzentrationsbereich Verschleppungen auf. Für Isophorondiamin entspricht die Verschiebung der Gerade nach oben einer Aminmasse von 27 pg, bei 4,4'-Diaminodiphenylsulfid einer Aminmasse von 0,8 pg (Tabelle 9). Die Verschleppungseffekte sind somit quantitativ ähnlich wie im oberen Konzentrationsbereich (Tabelle 7).

Im unteren Konzentrationsbereich nimmt die Geradensteigung bei der Messung B (31 h) im Vergleich zu Messung A (5 h) bei 4,4'-Oxydianilin, 4,4'-MDA und o-Tolidin um 57 %, 39 % bzw. 37 % zu (Tabelle 8). Anschließend bleibt das Verfahren für 4,4'-MDA und 4,4'-Oxydianilin stabil: Die Änderungen von 3 % bzw. -5 % sind vernachlässigbar. Der Abbau von o-Tolidin zeigt sich im negativen Offset in Messung A, welcher einer o-Tolidinmasse von 5,5 pg entspricht (Tabelle 9), sowie in der Abnahme der Geradensteigung um 23 % zwischen Messung B und Messung C (Tabelle 8).

Bei 4,4'-MDA, 4,4'-Oxydianilin und o-Tolidin ist zu beachten, dass das UPLC-MS/MS-System eine ausreichende Einlaufphase benötigt, bevor die Messung der Proben und der Kalibrierlösungen erfolgt. Robuste Resultate und hohe Empfindlichkeiten werden erst nach dieser Einlaufphase erreicht.

Tabelle 5:
 Konzentrationsbereich in [pg/ μ L] der Kalibrierlösungen für die 26 untersuchten Amine in LSM-Mischung B. In beiden Konzentrationsbereichen wurden jeweils 10 Konzentrationen mit äquidistantem Konzentrationsabstand verwendet (z. B. 10, 20, ..., 80, 90, 100).

Amin Nr.	Amin	Faktor [#]	unterer Bereich		oberer Bereich	
			von	bis	von	bis
	Nominal-Konzentration	1,0	0,25	2,5	2,5	25
1	Anilin	1,2	0,30	3,00	3,0	30,0
2	Cyclohexylamin	6,0	1,49	14,92	14,9	149,2
3	1,3-Phenylendiamin	0,80	0,20	1,99	2,0	19,9
4	1,4-Phenylendiamin	6,1	1,52	15,15	15,2	151,5
5	1,4-Cyclohexandiamin	20,1	5,02	50,15	50,2	501,5
6	2,6-Dimethylanilin	2,2	0,55	5,46	5,5	54,6
7	2,4-Dimethylanilin	1,1	0,28	2,75	2,8	27,5
8	N,N-Dimethylanilin	2,4	0,59	5,94	5,9	59,4
9	2,6-TDA	2,0	0,50	5,01	5,0	50,1
10	2,4-TDA	3,0	0,75	7,50	7,5	75,0
11	4-Chloranilin	0,40	0,10	1,00	1,0	10,0
12	2,4,5-Trimethylanilin	2,0	0,50	4,98	5,0	49,8
13	1,3-Benzendimethanamin	20,6	5,16	51,55	51,6	515,5
14	3-Chlor-2-methylanilin	0,73	0,18	1,83	1,8	18,3
15	4-Chlor-2-methylanilin	0,4	0,10	1,02	1,0	10,2
16	2-Phenylimidazolin	1,0	0,26	2,61	2,6	26,1
17	1,5-Napthalendiamin	10,2	2,55	25,45	25,5	254,5
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	2,1	0,51	5,13	5,1	51,3
19	Isophorondiamin	2,1	0,54	5,36	5,4	53,6
20	4,4'-MDA	1,1	0,28	2,83	2,8	28,3
21	4,4'-Oxydianilin	3,1	0,79	7,85	7,9	78,5
22	o-Tolidin	6,0	1,50	15,00	15,0	150,0
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	0,80	0,20	1,99	2,0	19,9
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	1,0	0,25	2,49	2,5	24,9
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	1,2	0,30	3,01	3,0	30,1
26	d5-Anilin	1,1	0,26	2,64	2,6	26,4

[#] Der Faktor beschreibt das Verhältnis der Ist-Konzentration zur Nominal-Konzentration in der ersten Zeile der Tabelle
 Beispiele: Faktor 1,0 entspricht 0,25 pg/ μ L bis 25 pg/ μ L
 Faktor 2,0 entspricht 0,50 pg/ μ L bis 50 pg/ μ L

Tabelle 6:
Stabilität der untersuchten Amine in LSM-Mischung B: Veränderung der Geradensteigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden (mit $y_0 = 0!$) innerhalb von 3 Tagen im oberen Kalibrierbereich bei Injektion von 5 μ L. Zeit zwischen Herstellung der Kalibrierstandards und Injektion: A: 8 h, B: 34h, C: 75 h.

Amin Nr.	Amin	A [1/pg]	B [1/pg]	B/A-1 [%]	C [1/pg]	C/B-1 [%]
1	Anilin	2.010	964	-52	761	-21
2	Cyclohexylamin	476	313	-34	281	-10
3	1,3-Phenylendiamin	2391	2.310	-3	2.080	-10
4	1,4-Phenylendiamin	1.090	1.170	8	1.090	-7
5	1,4-Cyclohexandiamin	49	46	-7	47	1
6	2,6-Dimethylanilin	3.790	3680	-3	3.650	-1
7	2,4-Dimethylanilin	4.890	5.090	4	5.120	0
8	N,N-Dimethylanilin	7.310	9.130	25	7.390	-19
9	2,6-TDA	893	974	9	902	-7
10	2,4-TDA	1.210	1.270	5	1.180	-7
11	4-Chloranilin	4.560	4.400	-4	4.200	-4
12	2,4,5-Trimethylanilin	1.330	1.325	0	1.290	-3
13	1,3-Benzendimethanamin	67	72	7	82	14
14	3-Chlor-2-methylanilin	1.540	1.380	-10	1.350	-3
15	4-Chlor-2-methylanilin	4.550	4.020	-12	4.020	0
16	2-Phenylimidazol	3.010	2.780	-8	2.360	-15
17	1,5-Napthalendiamin	131	220	68	154	-30
18	Diaminotrimethylhexan-Isomeren-Mischung	2.060	2.430	18	3.140	29
19	Isophorondiamin	2.370	3.040	28	3.270	8
20	4,4'-MDA	8.350	9.960	14	9.880	3
21	4,4'-Oxydianilin	1.840	2.220	20	2.170	-2
22	o-Tolidin	434	574	32	537	-6
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	6.400	6.740	5	6.370	-5
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	7.520	7.520	0	6.930	-8
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	3.620	3.740	3	3.200	-14
26	d5-Anilin	3.020	1.867	-38	1.540	-18

Rot markiert: starke Abnahme der Steigung (< -25 %)

Grün markiert: starke Zunahme der Steigung (> 25 %)

Tabelle 7:
Steigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden sowie Bestimmtheitsmaß R^2 der untersuchten Amine in LSM-Mischung B bei Injektion von 5 μL im oberen Kalibrierbereich. Soweit nicht anders angegeben wurde Messung B (siehe Tabelle 6) eingesetzt und $y_0 = 0!$ verwendet.

Amin Nr.	Amin	SNR =3 [pg/ μL]	Steigung m' [counts/pg]	Bestimmtheitsmaß R^2 [-]
1	Anilin*	0,3	2.010*	0,994*
2	Cyclohexylamin*	1,5	476*	0,963*
3	1,3-Phenylendiamin	0,2	2.310	0,995
4	1,4-Phenylendiamin*	3,0	1.140*	0,997*
			$y_0 = -27.300$ bzw. -24 pg	
5	1,4-Cyclohexandiamin	10,0	46	0,996
6	2,6-Dimethylanilin	0,5	3680	0,997
7	2,4-Dimethylanilin	0,3	5.090	0,998
8	N,N-Dimethylanilin	0,6	9.130	0,995
9	2,6-TDA	0,5	974	0,997
10	2,4-TDA	0,7	1.270	0,999
11	4-Chloranilin	0,1	4.400	0,998
12	2,4,5-Trimethylanilin	1,0	1.325	0,998
13	1,3-Benzendimethanamin	15,0	72	0,990
14	3-Chlor-2-methylanilin	0,2	1.380	0,997
15	4-Chlor-2-methylanilin	0,1	4.020	0,996
16	2-Phenylimidazolin	0,2	2.780	0,999
17	1,5-Naphtalendiamin*	10,0	137*	0,999*
			$y_0 = -5.370$ bzw. -39 pg	
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	2,0	2.430	0,988
19	Isophorondiamin	0,5	3.040	0,998
			$y_0 = 68.200$ bzw. +22 pg	
20	4,4'-MDA	0,3	9.960	0,999
21	4,4'-Oxydianilin	0,8	2.220	0,998
22	o-Tolidin	3,0	574	0,997
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	0,2	6.630	0,998
			$y_0 = 7.280$ bzw. +1,0 pg	
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	0,3	7.520	0,994
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	0,6	3.740	0,999
26	d5-Anilin*	0,3	3.010*	0,992*

* Verwendung der Messung A wegen Instabilität (siehe Tabelle 6)

Tabelle 8:
 Stabilität der untersuchten Amine in LSM-Mischung B: Veränderung der Geradensteigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden (mit $y_0 = 0!$) innerhalb von 3 Tagen im unteren Kalibrierbereich bei Injektion von 5 μ L. Zeit zwischen Herstellung der Kalibrierstandards und Injektion: A: 5 h, B: 31h, C: 72 h.

Amin Nr.	Amin	A [1/pg]	B [1/pg]	B/A-1 [%]	C [1/pg]	C/B-1 [%]
1	Anilin	2.210	735	-67	526	-28
2	Cyclohexylamin	659	399	-39	335	-16
3	1,3-Phenylendiamin	2.160	2.240	4	1.812	-19
4	1,4-Phenylendiamin	633	501	-21	117	-77
5	1,4-Cyclohexandiamin	40	39	-1	43	9
6	2,6-Dimethylanilin	3.810	4.410	16	4.390	0
7	2,4-Dimethylanilin	5.250	4.460	-15	5.530	22
8	N,N-Dimethylanilin	7.590	9.540	26	8.340	-13
9	2,6-TDA	1.110	1.080	-2	903	-16
10	2,4-TDA	1.260	1.100	-13	853	-23
11	4-Chloranilin	4.700	4.480	-5	4.310	-4
12	2,4,5-Trimethylanilin	1.370	1.410	3	1.320	-6
13	1,3-Benzendimethanamin	56	56	0	64	14
14	3-Chlor-2-methylanilin	1.650	1.410	-15	1.410	0
15	4-Chlor-2-methylanilin	4.670	4.110	-12	3.960	-4
16	2-Phenylimidazol	3.250	2.920	-10	2.380	-19
17	1,5-Napthalendiamin	84	93	11	24	-74
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	1.770	1.790	1	2.870	61
19	Isophorondiamin	3.060	2.910	-5	2.930	1
20	4,4'-MDA	6.610	9.170	39	9.480	3
21	4,4'-Oxydianilin	1.440	2.270	57	2.160	-5
22	o-Tolidin	425	582	37	450	-23
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	6.240	7.260	16	6.610	-9
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	6.930	8.030	16	7.110	-11
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	3.070	3.810	24	3.140	-18
26	d5-Anilin	3.600	1.600	-56	1.080	-32

Rot markiert: starke Abnahme der Steigung (< -25 %)

Grün markiert: starke Zunahme der Steigung (> 25 %)

Tabelle 9:
Steigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden sowie Bestimmtheitsmaß R^2 der untersuchten Amine in LSM-Mischung B bei Injektion von 5 μL im unteren Kalibrierbereich. Soweit nicht anders angegeben wurde Messung B eingesetzt und $y_0 = 0!$ verwendet.

Amin Nr.	Amin	SNR =3 [pg/ μL]	Steigung m' [counts/pg]	Bestimmtheitsmaß R^2 [-]
1	Anilin	0,3	2.210*	0,994*
2	Cyclohexylamin	1,5	659*	0,963*
3	1,3-Phenylendiamin	0,2	2.240	0,987
4	1,4-Phenylendiamin	3,0	761*	0,977*
			$y_0 = 6.810$ bzw. -9 pg	
5	1,4-Cyclohexandiamin	10,0	39	0,979
6	2,6-Dimethylanilin	0,5	4.410	0,997
7	2,4-Dimethylanilin	0,3	4.460	0,991
8	N,N-Dimethylanilin	0,6	9.540	0,946
9	2,6-TDA	0,5	1.080	0,992
10	2,4-TDA	0,7	1.100	0,977
11	4-Chloranilin	0,1	4.480	0,995
12	2,4,5-Trimethylanilin	1,0	1.410	0,989
13	1,3-Benzendimethanamin	15,0	56	0,988
14	3-Chlor-2-methylanilin	0,2	1.410	0,981
15	4-Chlor-2-methylanilin	0,1	4.100	0,986
16	2-Phenylimidazolin	0,2	2.920	0,987
17	1,5-Napthalendiamin	10,0	97*	0,976*
			$y_0 = -1.180$ bzw. -12 pg	
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	2,0	1.790	0,994
19	Isophorondiamin	0,5	2.910	0,986
			$y_0 = 79.500$ bzw. +27 pg	
20	4,4'-MDA	0,3	9.170	0,999
21	4,4'-Oxydianilin	0,8	2.270	0,995
22	o-Tolidin	3,0	474*	0,978*
			$y_0 = -2.630$ bzw. -5,5 pg	
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	0,2	6.500	0,999
			$y_0 = 5.290$ bzw. +0,8 pg	
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	0,3	8.030	0,999
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	0,6	3.810	0,997
26	d5-Anilin	0,3	3.600*	0,986*

* Verwendung der Messung A wegen Instabilität des Analyten (siehe Tabelle 8)

Tabelle 10:
Kalibrier-Konzentrationen mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) größer gleich 3 bei isokratischer UPLC-Methode und Injektion von 5 µL ins UPLC-MS/MS-Gerät.

Amin Nr.	Amin	SNR >3 direkt [µg/L]	SNR >3 mit SPE* [µg/L]
11	4-Chloranilin	0,1	0,008
15	4-Chlor-2-methylanilin	0,1	0,008
3	1,3-Phenylendiamin	0,2	0,016
14	3-Chlor-2-methylanilin	0,2	0,016
16	2-Phenylimidazolin	0,2	0,016
23	4,4'-Diaminodiphenylsulfid	0,2	0,016
1	Anilin	0,3	0,024
7	2,4-Dimethylanilin	0,3	0,024
20	4,4'-MDA	0,3	0,024
24	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	0,3	0,024
26	d5-Anilin	0,3	0,024
6	2,6-Dimethylanilin	0,5	0,040
9	2,6-TDA	0,5	0,040
19	Isophorondiamin	0,5	0,040
8	N,N-Dimethylanilin	0,6	0,048
25	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)	0,6	0,048
10	2,4-TDA	0,7	0,056
21	4,4'-Oxydianilin	0,8	0,064
12	2,4,5-Trimethylanilin	1,0	0,08
2	Cyclohexylamin	1,5	0,12
18	Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung	2,0	0,16
4	1,4-Phenylendiamin	3,0	0,24
22	o-Tolidin	3,0	0,24
5	1,4-Cyclohexandiamin	10,0	0,8
17	1,5-Napthalendiamin	10,0	0,8
13	1,3-Benzendimethanamin	15,0	1,2

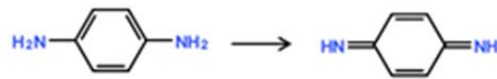
Aufkonzentrierung von 50 mL auf 2 mL um den Faktor 25 in Kombination mit 50 % Wiederfindung als Berechnungsgrundlage

Die Nachweisstärke des Messverfahrens kann durch Injizieren eines größeren Probenvolumens, beispielsweise 100 µL statt 5 µL, weiter gesteigert werden.

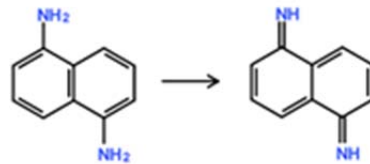
4.2 Stabilität der Amine

Unter den ausgewählten 26 Aminen sind 3 aromatische Amine enthalten, die sehr schnell abgebaut werden. Diese 3 Amine können zum entsprechenden Chinon-Derivat dehydriert bzw. oxidiert werden (Bild 20).

a) 1,4-Phenylendiamin



b) 1,5-Naphthalendiamin



c) o-Tolidin

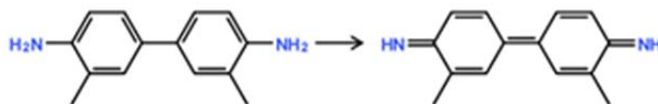


Bild 20:

Besonders leicht oxidierbare Amine vor und nach der Oxidation/Dehydrierung: **a)** 1,4-Phenylendiamin, **b)** 1,5-Naphthalendiamin und **c)** o-Tolidin.

Die 3 instabilen Amine degradieren bereits innerhalb weniger Tage bzw. Stunden. Infolge dessen müssten die Amin-Lösungen für die Kalibrierstandards sowie für die Zudosierung bei den SPE-Experimenten jedes Mal frisch angesetzt werden. Dieser Aufwand konnte im Rahmen dieses Projektes nicht durchgehend betrieben werden. Daher fehlen bei einigen Versuchsreihen diese 3 Amine bei der Darstellung der Ergebnisse.

Ein weiterer Effekt, der zu Verlusten bei den drei instabilen Aminen führen kann, ist die Adsorption an Gefäßwände. Durch die flache Struktur in Kombination mit der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und der Wechselwirkung über das polarisierbare aromatische π -System wird die Adsorption an Glasgefäß-Oberflächen und Oberflächen im UPLC-MS/MS-System begünstigt.

4.3 Festphasenextraktion (SPE)

4.3.1 SPE mit Umkehrphase (RP)

Anleitung für die SPE mit Umkehrphase:

1. SPE-Kartusche:
CHROMABOND® HR-P, 3 mL, 200 mg, , Styrol-Divinylbenzol-Copolymer
2. Wasserproben mit 1 M Natronlauge auf pH 9 einstellen.
3. Konditionierung mit 2 mL Methanol, 2 mL Acetonitril und 2 mL 0,01 mM Natronlauge.
4. Probenaufgabe: 100 mL mit 10 mL/min
5. Waschen mit 2 mL Reinstwasser
6. Anschließend 5 min. trocknen
7. Elution mit 3 x 1 mL 1:1 Methanol/Acetonitril-Mischung

Bei der Umkehrphasen-SPE müssen die in der Probe enthaltenen Amine mit Natronlauge auf einen pH-Wert über 9 (bei aliphatischen Aminen besser über 10) eingestellt werden. Das im Trinkwasser enthaltene Calcium fällt bei den üblichen Konzentrationen noch nicht als Calciumhydroxid aus. Wenn jedoch Phosphat zugegen ist, fällt bei pH 10 das 350-fach geringer lösliche Calciumphosphat als Gel aus und verstopft die Poren der SPE-Säule. Das bedeutet, dass beim Ansäuern der Wasserprobe auf eine andere Säure ausgewichen werden muss, z. B. auf Salzsäure, wenn die Wasserprobe anschließend einer RP-SPE unterzogen werden soll.

Die Anreicherung auf SPE-Kartuschen mit einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer bei pH 9 mit anschließender Elution mit einer 1:1 Methanol/Acetonitril-Mischung funktioniert nicht für alle untersuchten Amine (Bild 21). Die 3 hydrophilen aromatischen Amine (1,3-Phenylendiamin, 2,4-TDA, 2,6-TDA), die 4 aliphatischen Amine (Cyclohexylamin, 1,4-Cyclohexandiamin, Diaminotrimethylhexan-Isomerenmischung, Isophorondiamin) sowie 2-Phenylimidazolin werden aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit nicht an die Festphase gebunden. Die Amine 4,4'-MDA, 4,4'-Oxydianilin, o-Tolidin sowie 4,4'-Diaminodiphenylsulfid lassen sich nur schwer von der Festphase eluieren. Bei 8 aromatischen Aminen ist die Wiederfindung sehr gut. Die Ergebnisse bestätigen damit im Wesentlichen die Erfahrungen aus der ersten Projektphase.

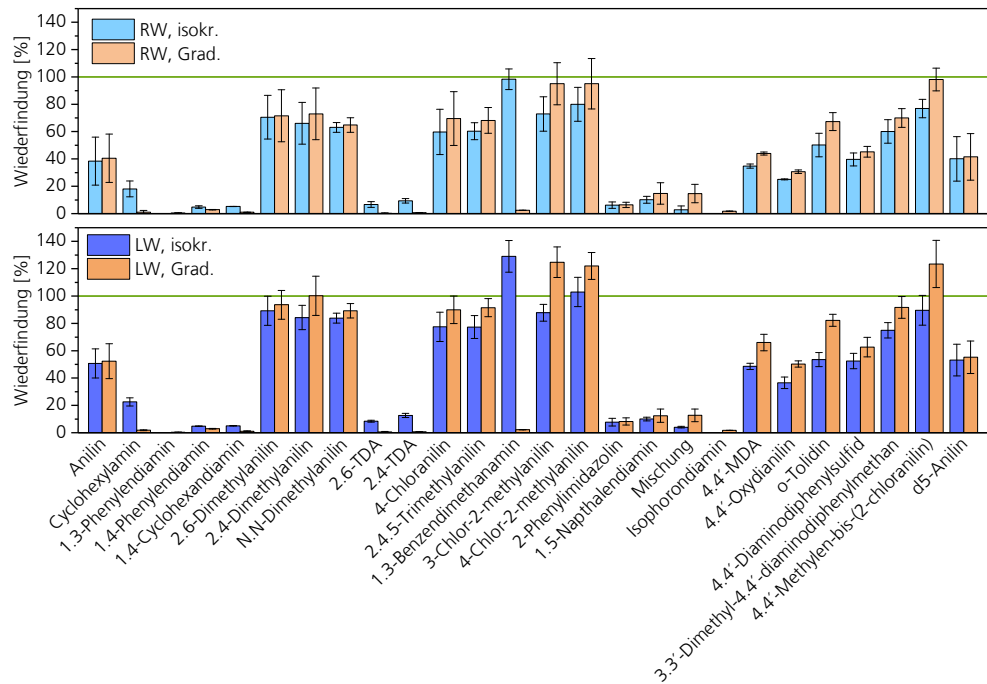


Bild 21:
Wiederfindung für die 26 untersuchten Amine bei Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase (CHROMABOND® HR-P). RW = Reinstwasser; LW = Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase; isokr. = isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-Methode.

4.3.2 SPE mit Kationentauscher (XC)

Anleitung für die SPE mit Kationentauscher:

1. Probenvorbereitung: Falls nicht bereits im Vorfeld geschehen, muss die Wasserprobe mit einer Säure, z. B. Phosphorsäure, auf pH 2 eingestellt werden (500 µL 85 %ige H₃PO₄ pro Liter).
2. SPE-Kartusche:
CHROMABOND® HR-XC, Sulfonsäuremodifikation, 6 mL, 500 mg, Kapazität: 1 µmol/mg Kationenäquivalente
=> 500 µmol Kationenäquivalente/Kartusche
3. Konditionierung mit 2 x 4 mL Methanol und 2 x 4 mL Reinstwasser
4. Probenaufgabe:
250 mL 1:5-verdünntes Leitungswasser (Leitungswasser Holzkirchen: 8,5 µmol/mL Kationenäquivalente => 425 µmol Kationenäquivalente) oder
50 mL Leitungswasser mit max. 9,9 µmol/mL Kationenäquivalente
5. Waschen mit 3 x 4 mL 40 mM Ammoniumphosphatpuffer (pH 2,2)
=> 12 mL x 40 µmol/mL NH₄⁺ = 480 µmol NH₄⁺
6. Waschen mit 4 mL 40 mM Ammoniumformiatlösung (pH 6,9)
=> 4 mL x 40 µmol/mL NH₄⁺ = 160 µmol NH₄⁺
=> insg. 640 µmol NH₄⁺

7. Lösungsmittelwechsel mit Methanol-Wasser-Mischung 1:1 (zur Vermeidung der Erhitzung durch Mischungsenthalpie)
8. Waschen mit 3 x 4 mL Methanol
9. Elution mit 1 M Isopropylamin in Methanol

Als „Probe“ für die Kationentauscher-SPE diene Reinstwasser bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (Harz A mit kurzer Mischkammer; November 2015). Die Verfahrensentwicklung erfolgte durch Zudosierung einer Aminmischung zur Probe. Die Aminkonzentration nach der Zudosierung lag zwischen 4 und 96 µg/L (Bild 22). Die 4,4'-MDA-Konzentration betrug 28 µg/L.

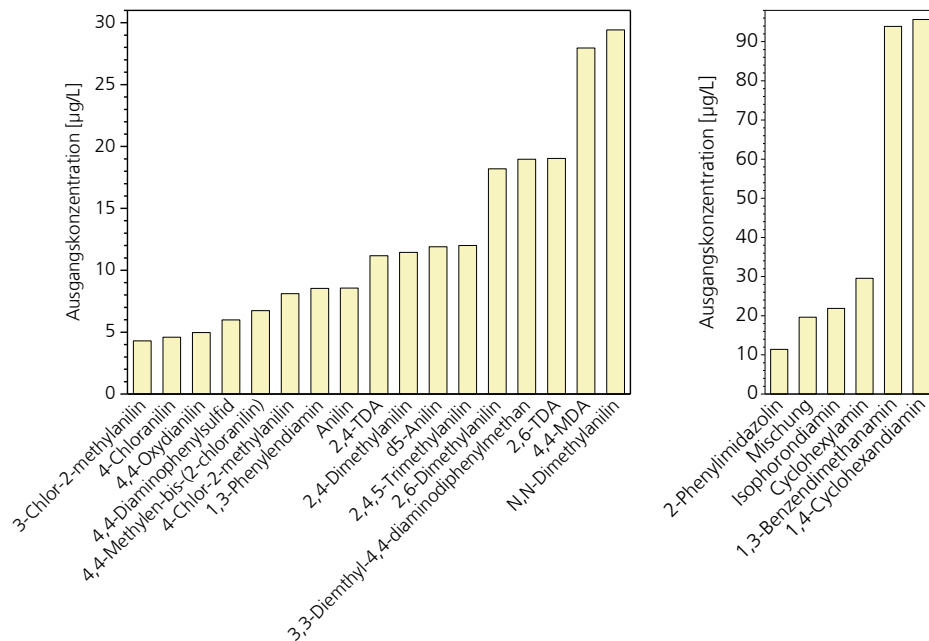


Bild 22:
Aminkonzentrationen in der Lösung für die Festphasenextraktion.

Für die Elution der aliphatischen Amine werden sehr starke Basen benötigt (pK_s -Wert eines primären Alkylammoniums: ca. 10,6). Obwohl Methylamin und Isopropylamin annähernd denselben pK_s -Wert besitzen, unterscheidet sich die Elutionsstärke einer 1 M Methylamin-Lösung und einer 1 M Isopropylamin-Lösung in Methanol deutlich voneinander (Bild 23). Mit der Isopropylamin-Lösung werden sehr gute Wiederfindungsraten zwischen 70 und 130 % erhalten, mit der Methylamin-Lösung bleibt dagegen die Wiederfindung bei den aliphatischen Aminen, dem Benzylamin-Derivate und dem Imidazolin-Derivat – also bei stark basischen Aminen – unter 20 % (Bild 23, rechts).

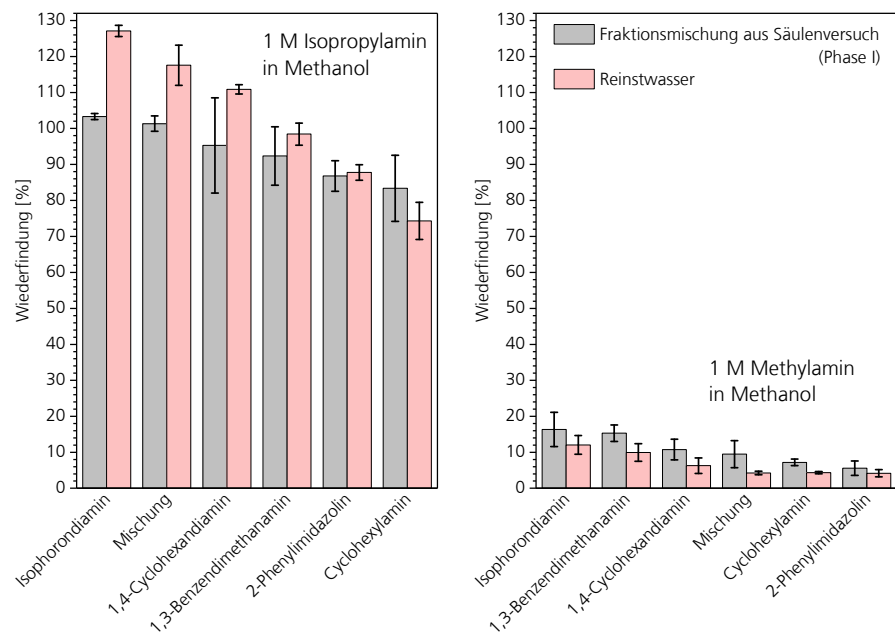


Bild 23:

Wiederfindung für die 6 aliphatischen Amine mit 2 verschiedenen Elutions-Lösungen: Links: 1 M Isopropylamin in Methanol, Rechts: 1 M Methylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa) bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (grau).

Die Elution der aromatischen Amine mit 1 M Methylamin-Lösung ergibt eine Wiederfindung zwischen 55 und 81 % für 15 der 17 stabilen aromatischen Amine (Bild 24). Die Wiederfindung bei Anilin und d5-Anilin ist mit 33 bis 54 % wesentlich geringer. Auch die Wiederfindung von 4,4-Methylen-bis-(2-chloranilin) fällt mit 52 bzw. 46 % gering aus. Der Unterschied zwischen Proben mit und ohne Salzfracht (graue bzw. rosa Balken in Bild 24) ist gering.

Für die Versuche mit Salzfracht in der Probe wurde eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase verwendet (Harz A, kurze Mischkammer). Harzinjektion, Harzelution und UPLC-MS/MS-Analytik erfolgten bereits im Dezember 2015. Damals wurde eine 4,4'-MDA-Konzentration von maximal 30 µg/L bestimmt, wobei ein negativer Matrixeffekt unberücksichtigt blieb. Die „Wiederfindung“ von 211 % 4,4'-MDA entspricht einer bereits vor der Zudosierung (28 µg/L = 100 %) vorhandenen Konzentration von 31 µg/L. Da das ISV-Eluat vor der SPE um den Faktor 5 verdünnt wurde, beträgt die Konzentration im eingesetzten ISV-Eluat 155 µg/L und liegt damit etwa 5-mal höher als im November des Jahres 2015. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass in angesäuerten Proben (H₃PO₄, pH 2) auch noch nach 21 Monaten Lagerung bei Zimmertemperatur noch 4,4'-MDA nachgewiesen werden kann. Es zeigt aber auch, dass in frischen ISV-Eluaten von PUR-Injektionsharzen anscheinend ein Teil des 4,4'-MDAs in Form von Kondensationsprodukten vorliegen, die zumindest im sauren Milieu im Laufe der Zeit hydrolysieren und 4,4'-MAD freisetzen.

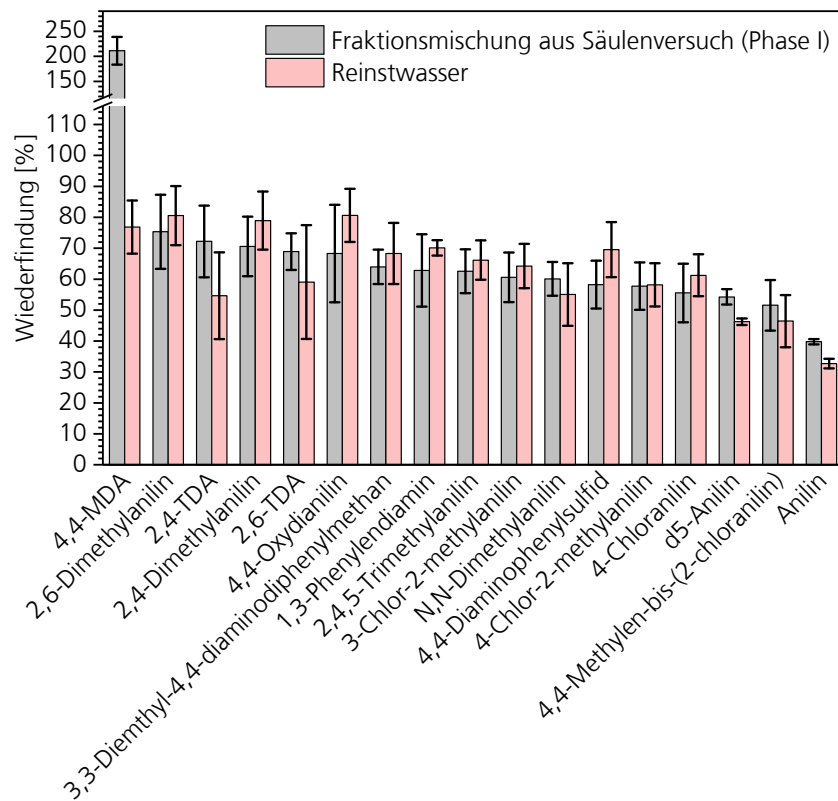


Bild 24:
Wiederfindung für die 17 stabilen aromatischen Amine. Elutionslösung:
1 M Methylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa, 2x) bzw.
eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten
Projektphase (grau, 2x). Letztere Proben enthalten bereits 4,4'-MDA (100 %
4,4'-MDA entspricht 28 µg/L).

Die Elution der aromatischen Amine mit 1 M Isopropylamin-Lösung ergibt ei-
ne Wiederfindung zwischen 60 und 108 % für 15 der 17 stabilen aromati-
schen Amine (Bild 25). Die Wiederfindung bei Anilin und d5-Anilin ist, wie
auch bei der Elution mit Methylamin, mit 35 bis 58 % wesentlich geringer.
Die Eignung von d5-Anilin als Interner Standard für die SPE ist damit einge-
schränkt.

In den Proben aus dem Inversen Säulenversuch von 2015 beträgt die „Wie-
derfindung“ 264 %, das entspricht einer bereits vor der Zudosierung in der
Wasserprobe enthaltenen 4,4'-MDA-Konzentration von 46 µg/L bzw. von
230 µg/L im ursprünglichen ISV-Eluat.

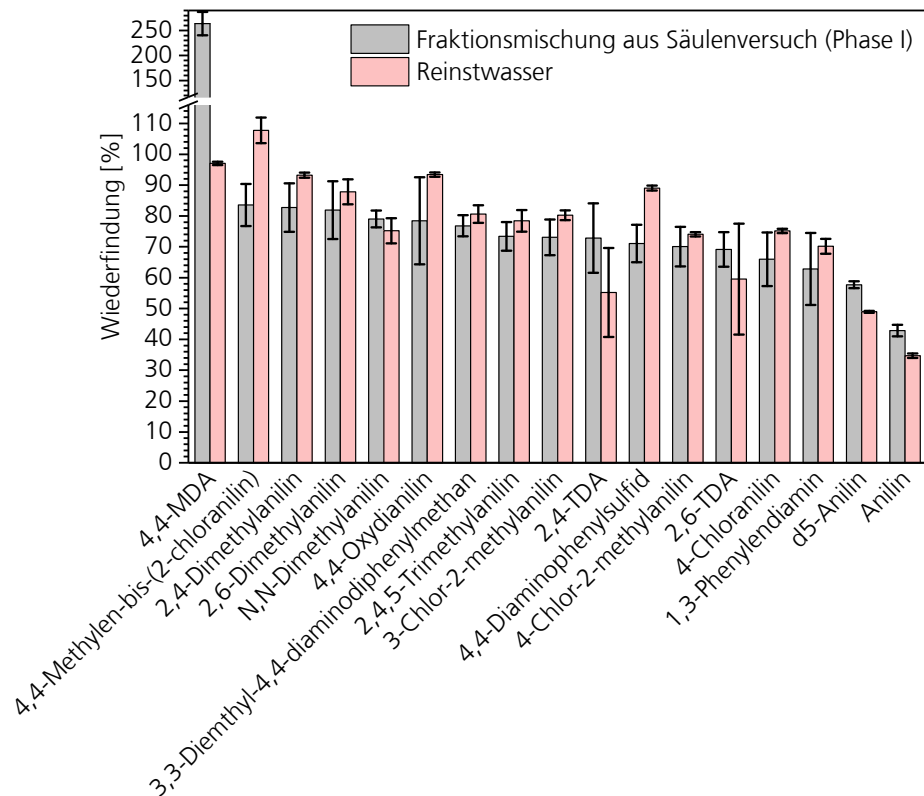


Bild 25:
Wiederfindung für die 17 stabilen aromatischen Amine. Elutionslösung: 1 M Isopropylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa, 2x) bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (grau, 2x). Letztere Proben enthalten bereits 4,4'-MDA (100 % 4,4'-MDA entspricht 28 µg/L).

4.3.3 Einengen des SPE-Elutionsmittels (XC)

Bei der Festphasenextraktion mit Kationentauschern ist es nötig, dem Elutionslösungsmittel ein Amin in hohen Konzentrationen als „Hilfsamin“ zuzugeben, um die gebundenen Amine zu deprotonieren und von der SPE-Kartusche eluieren zu können. Diese Hilfsamine müssen vor der Injektion ins UPLC-MS/MS-Gerät entfernt werden. Hierzu wird das Elutionsmittel (2 mL) eingengt; dabei wird das Hilfsamin zusammen mit dem Methanol entfernt und nach und nach durch Acetonitril ersetzt (4 x 2 mL). Am Ende wird die eingengte Acetonitril-Lösung (0,6 bis 0,8 mL) mit verdünnter Ameisensäure auf 2 mL aufgefüllt. Dadurch wird ein Lösungsmittelgemisch erhalten, das dem Laufmittel der isokratischen UPLC-Methode entspricht (34,9 % Acetonitril) bzw. diesem nahekommt.

Abdampfprozedur:

1. Spülgas: Stickstoff
2. Heizblock-Temperatur: 45 °C.
3. Volumen der Gefäße zum Einengen: ca. 10 mL, mind. 4 mL.
4. Methanolische Aminlösung einfüllen.
5. Füllstand von 2 mL markieren.
6. Einengen der methanolischen Aminlösung auf etwa 800 µL.
7. Zugabe von 2 mL Acetonitril.
8. Einengen der Mischung auf etwa 800 µL.
9. 1- bis 2-mal Wiederholen der Schritte 2 und 3.
10. Auffüllen bis zur 2 mL-Marke mit Acetonitril.
11. Überprüfen der Unterschreitung der kritischen Aminkonzentration durch Entnahme von 20 µL Lösung und Zugabe zu 480 µL methanolischer Bromthymolblau-Lösung => Lösung bleibt gelb => Aminkonzentration ist kleiner als 2 mM.
12. Ggf. Schritte 5 und 7 wiederholen, bis Bedingung bei Schritt 11 erfüllt ist.
13. Einengen der Mischung auf etwa 700 µL.
14. Übertragen der Lösung in einen 2 mL Messkolben und Auffüllen mit verdünnter Ameisensäure auf 2 mL. Mit einem Teil der verd. Ameisensäure das Abdampfgefäß spülen.

Standardadditionsversuche ergaben, dass Isopropylamin unterhalb einer Konzentration von 2 mM keine störenden Effekte bei der UPLC-MS/MS-Analytik hervorruft. Um eine Isopropylaminkonzentration unter 2 mmol/L zu garantieren, wird der Acetonitrillösung ein Aliquot entnommen und einer methanolischen Bromthymolblaulösung zugegeben. Dabei wird die Probe um Faktor 25 verdünnt. Eine Konzentration von 2 mM Isopropylamin in der Probe entspricht damit einer 0,08 mM methanolischen Isopropylamin-Lösung. In Bild 26 sind Vials mit Lösungen mit definierten Isopropylamin-Konzentrationen abgebildet, die für den Farbvergleich herangezogen wurden.

Das Entfernen des Isopropylamins bei 45 °C funktioniert in Acetonitril und in Acetonitril/Methanol-Gemischen sehr gut. Die methanolische Bromthymolblaulösung bleibt spätestens nach dem dritten Zyklus gelb und weist keinerlei Grünfärbung auf (siehe Bild 26 ganz links und in Bild 42 auf Seite 68 die Proben P0, P7 und P8).

In der SPE-Elutionslösung dürfen keine Spuren von Wasser enthalten sein, da die starken Wasserstoffbrückenbindungen des Ammonium-Hydrats ein vollständiges Abdampfen des Amins verhindern. Wässrige Amin-Lösungen, wie z. B. eine 70 %ige wässrige Ethylaminlösung, sind daher als Aminquelle für das XC-SPE-Elutionsmittel nicht geeignet.



Bild 26:

Kontrolle des pH-Wertes bzw. der molaren Amin-Konzentration mit Bromthymolblau in Methanol. Von links nach rechts: 0 mM, 0,08 mM, 0,4 mM, 2 mM, 8 mM, 40 mM Isopropylamin.

Bei dem Abdampfprozess findet neben dem erwünschten Entfernen des Hilfsamins und des Methanols auch ein unerwünschtes Aufkonzentrieren möglicher Verunreinigungen in der Lösung statt. Daher muss darauf geachtet werden, dass die eingesetzten Chemikalien sehr rein sind. Methanol ist i. d. R. sehr sauber. Das eingesetzte Acetonitril hatte HPLC-Qualität. Die Reinheit des Hilfsamins ist ein kritischer Aspekt; die Chemikalie ist ein potenter Eintragspfad für Verunreinigungen, welche zu starken Matrixeffekten führen können (siehe rechte vier Balken in Bild 27 bis Bild 32).

Der Abdampfprozess wurde auf zwei Aspekte hin untersucht:

1. Zum einen ist zu klären, ob die Analyten bei diesem Prozess zusammen mit dem Hilfsamin ebenfalls aus der Lösung entweichen oder ob Analyten durch die thermische und oxidative Belastung abgebaut werden. Dieser Effekt wird durch Zugabe von Standardlösung vor dem Abdampfprozess untersucht. („Verlust“ in Bild 27 bis Bild 33)
2. Zum anderen ist zu ermitteln, ob Verunreinigungen der Lösungsmittel oder des Hilfsamins zu Matrixeffekten bzw. zu einer Suppression führen. Dieser Effekt wird durch Zugabe von Standardlösung nach dem Abdampfprozess untersucht. („Suppr.“ in Bild 27 bis Bild 33)

Die Daten zur Wiederfindung von 4,4'-MDA und von 11 weiteren Aminen zeigen keinen Suppressionseffekt durch Isopropylamin im XC-SPE-Eluenten (Bild 27 bis Bild 29). Auch bei den Chlor-2-methylanilin-Derivaten sowie bei 1,5-Cyclohexandiamin und dem Diaminotrimethylhexan-Isomerengemisch tritt kein signifikanter Suppressionseffekt durch Isopropylamin bzw. durch Verunreinigungen in der Chemikalie auf (Bild 30). Bei d5-Anilin, o-Tolidin (beide in Bild 30), 4-Chloranilin, 1,3-Phenylendiamin und Cyclohexylamin

(Bild 31) liegen die Wiederfindungen bei etwa 80 %. Signifikante Suppressioneffekte weisen Anilin, 2,6-TDA und 2,4-TDA auf.

Geringe Verluste durch den Abdampfprozess treten bei den 12 Aminen in Bild 31 und Bild 32 sowie bei den Dimethylanilinen (Bild 28 und Bild 29) und bei Isophorondiamin (Bild 29) auf.

Die Wiederfindung der instabilen Amine 1,4-Phenylendiamin und 1,5-Naphthalendiamin liegt in keiner Probe über 20 %; auch die im Anschluss an das Einengen zugegebenen Konzentrationen sind kaum nachweisbar (Bild 32).

Die Wiederfindung bei den Proben mit Isopropylamin-Zusatz sind tendenziell höher als bei den Proben ohne Hilfsamin (Bild 33).

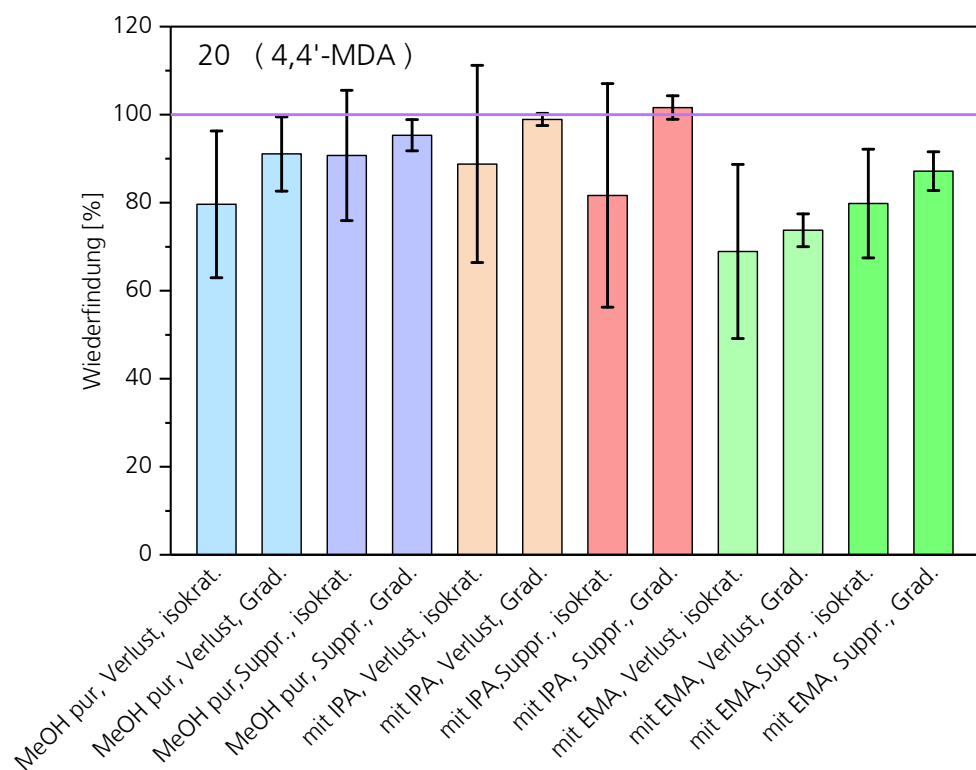


Bild 27:

Vergleich der Wiederfindung beim Einengen bzw. Abdampfen des SPE-Elutionsmittels und Ersetzen des Lösungsmittels von Methanol zu LSM-Mischung B bei 4,4'-MDA (Amin Nr. 20). IPA = Isopropylamin; EMA = N,N-Ethylmethylamin; isokr. = isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-Methode; Verlust: vor dem Abdampfen zugegebener Standard; Suppr.: Signalunterdrückung durch Matrixeffekte bei nach dem Abdampfen zugegebenen Standard.

Die Zuordnung bzw. Benennung und Farbcodierung bei den folgenden Bildern (Bild 28 bis Bild 32) ist analog zu Bild 27.

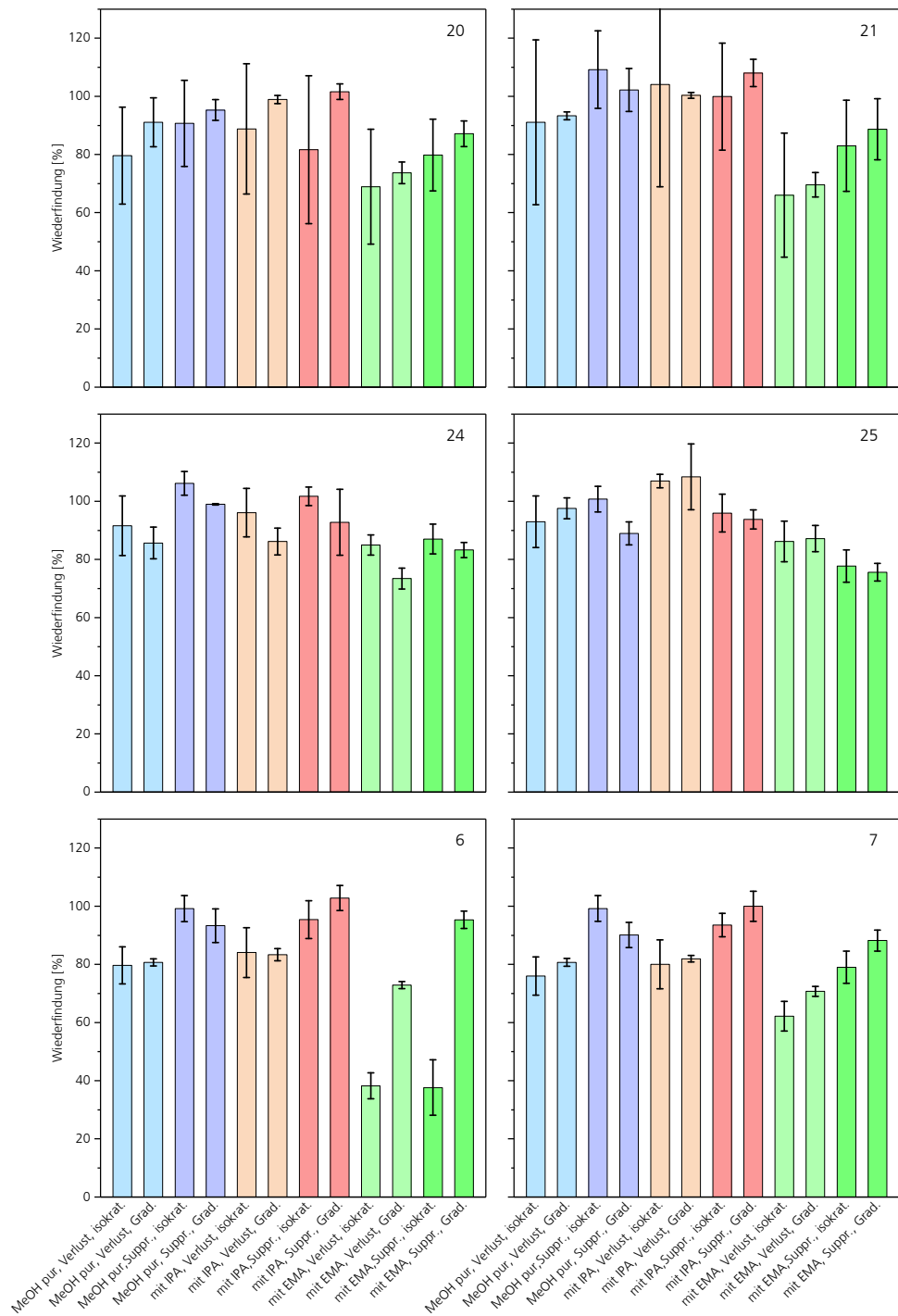


Bild 28:

Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungsmittels und ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisensäure. 20: 4,4'-MDA; 21: 4,4'-Oxydianilin; 24: 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan; 25: 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin); 6: 2,6-Dimethylanilin; 7: 2,4-Dimethylanilin.

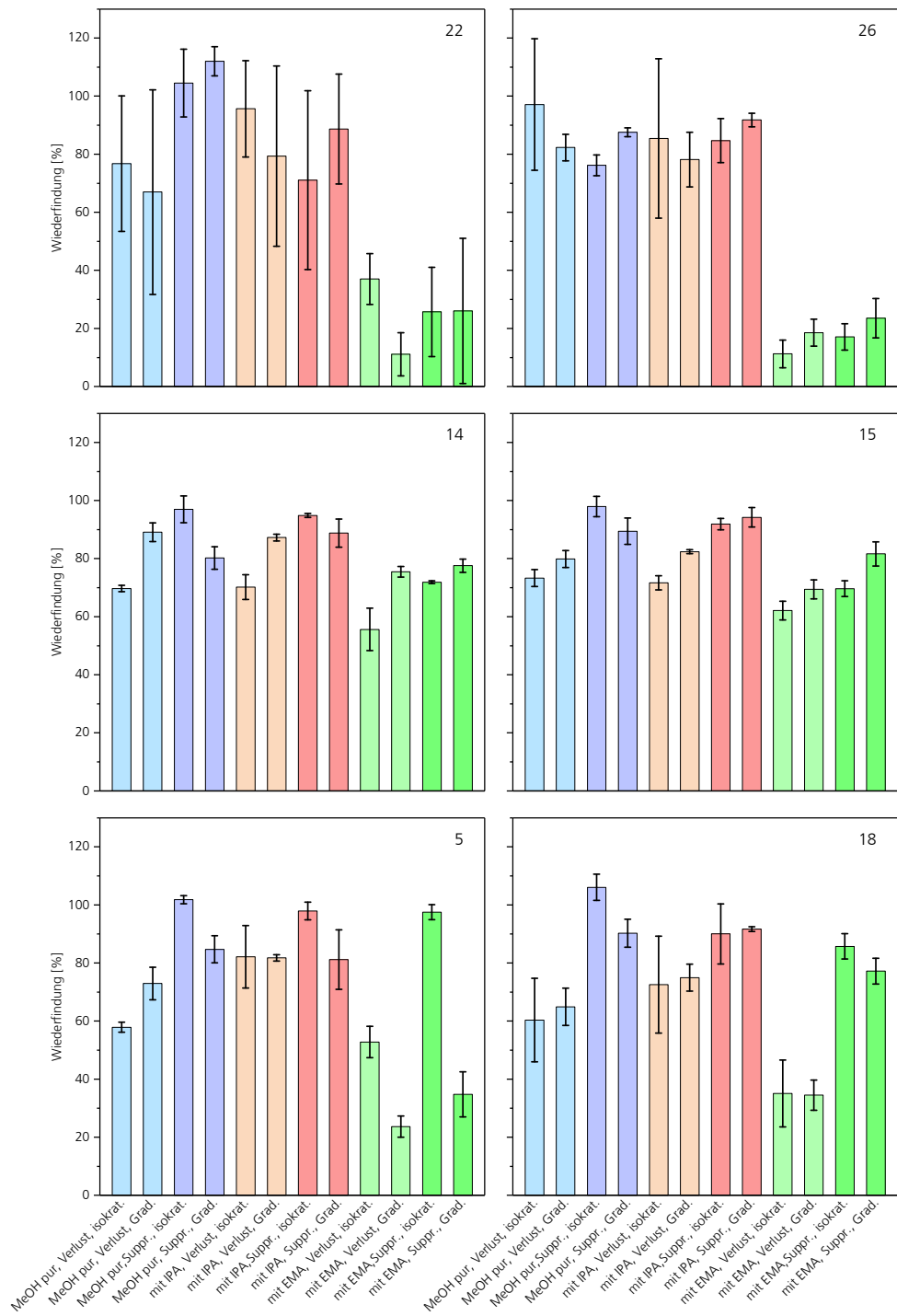


Bild 30:
 Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungsmittels und
 ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisensäure. 22: o-Tolidin;
 26: d5-Anilin; 14: 3-Chlor-2-methylanilin; 15: 4-Chlor-2-methylanilin;
 5: 1,4-Cyclohexandiamin; 18: Mischung aus 1,6-Diamino-2,2,4-
 trimethylhexan und 1,6-Diamino-2,4,4-trimethylhexan.

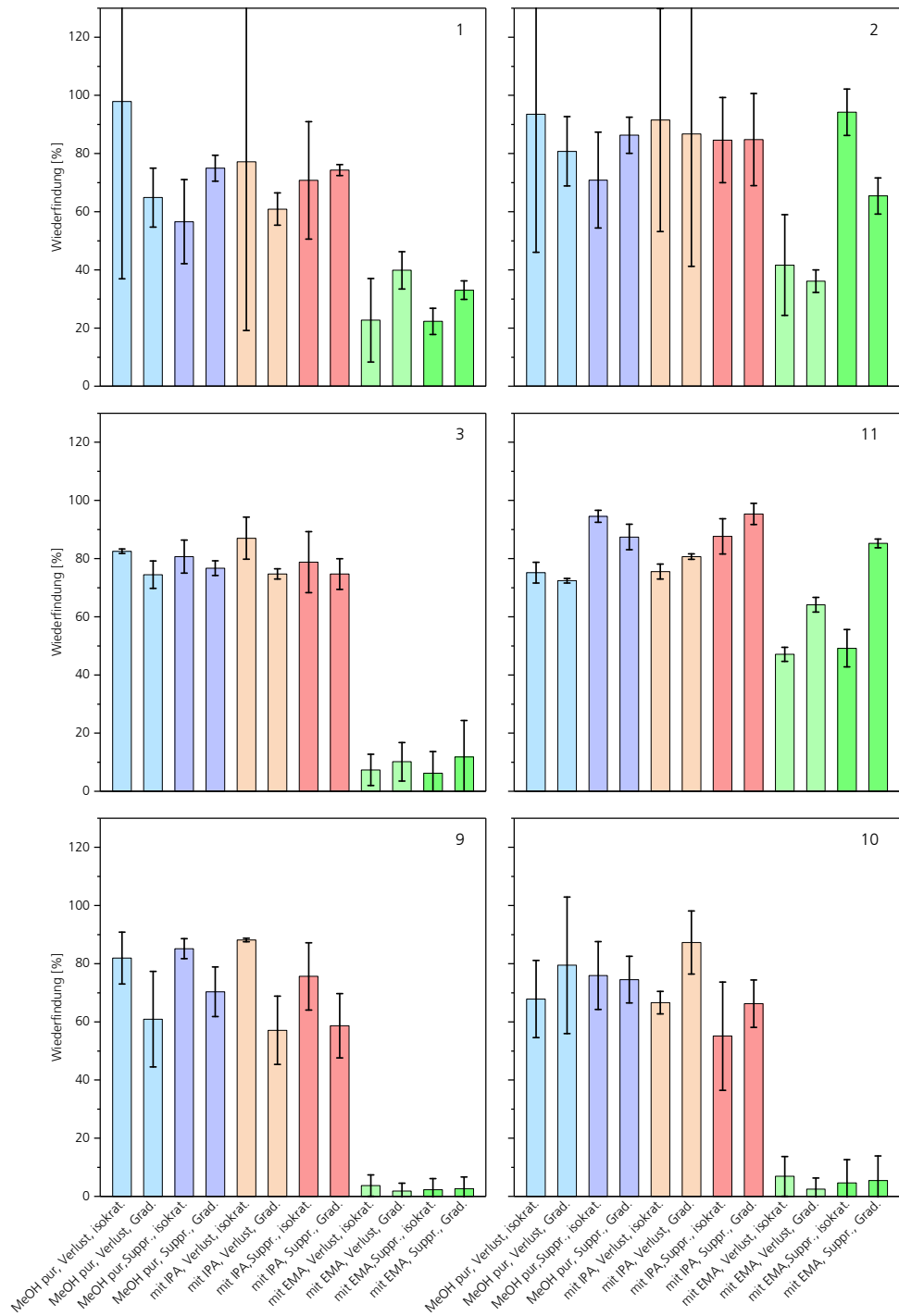


Bild 31:
 Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungsmittels und Ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisensäure. 1: Anilin; 2: Cyclohexylamin; 3: 1,3-Phenylendiamin; 11: 4-Chloranilin; 9: 2,6-TDA; 10: 2,4-TDA.

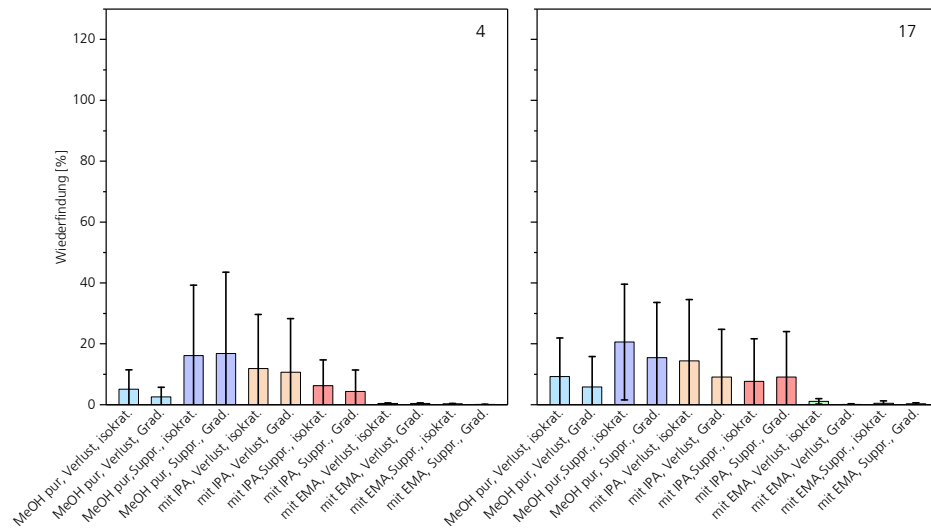


Bild 32:
 Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungsmittels und ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisensäure. 4: 1,4-Phenylendiamin; 17: 2,5-Naphthalendiamin.

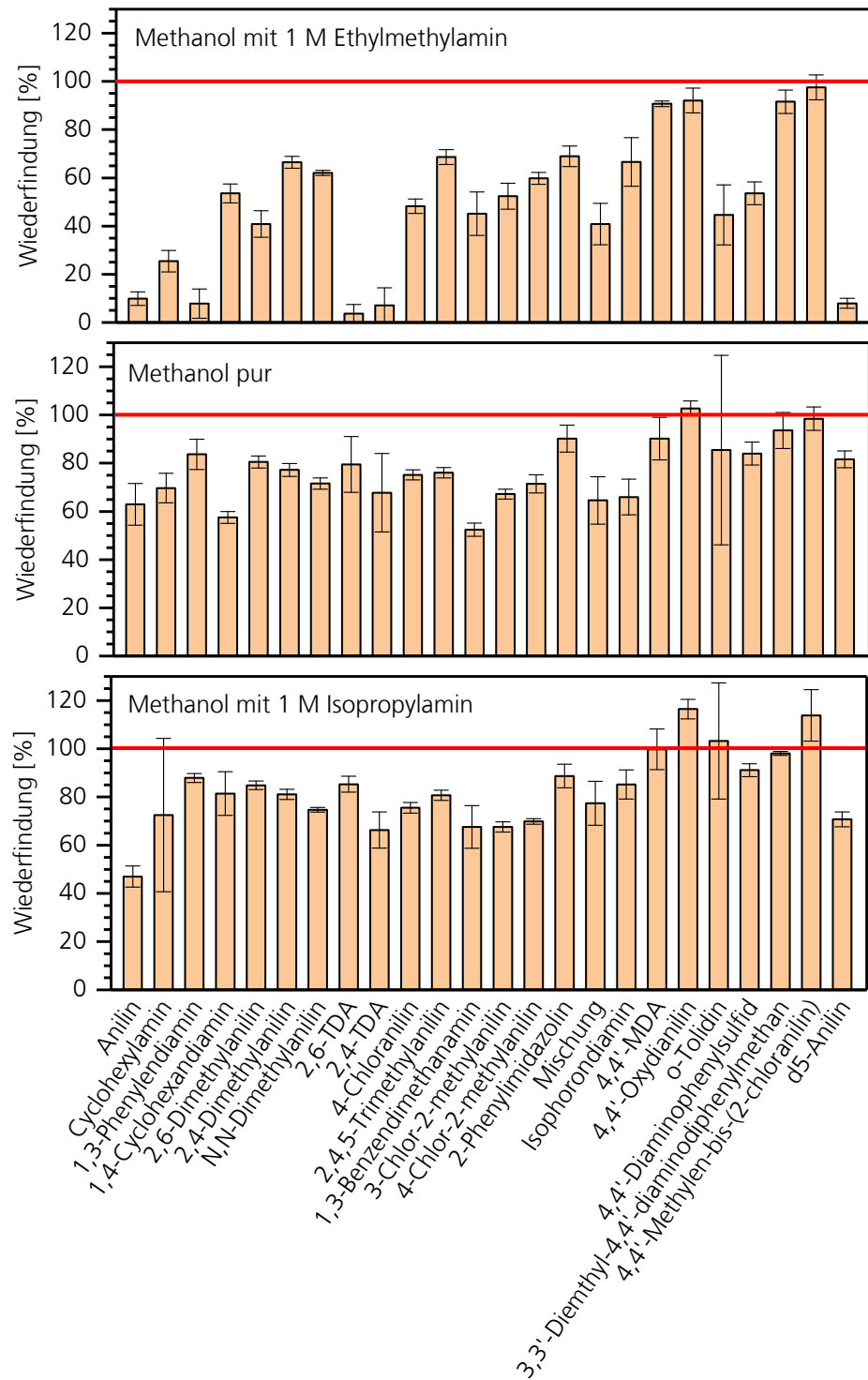


Bild 33:
 Vergleich der Amin-Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungsmittels und
 ersetzen durch Acetonitril mit anschließendem Auffüllen mit verdünnter
 Ameisensäure.

4.3.4 Zusammenfassung „Festphasenextraktion“

Insgesamt wurden 26 Amine untersucht, darunter 20 aromatische Amine, 2 Benzylamin-Derivate und 4 aliphatische Amine. Die 20 aromatischen Amine können weiter unterteilt werden in 3 besonders wasserlösliche Amine, 3 besonders instabile Amine, 3 chlorierte Aniline, deuteriertes und nicht-deuteriertes Anilin sowie 9 weitere aromatische Amine die nicht in die vorhergehenden Gruppen eingeordnet werden können.

Zwei der 26 untersuchten aromatischen Amine sind extrem instabil: 1,4-Phenylendiamin (4; Bild 35) und 1,5-Naphthalendiamin (17; Bild 37). Diese beiden Amine sind zum einen leicht oxidierbar bzw. dehydrierbar zum Chinin-Derivat (Bild 20) und zum anderen flach und polar (inkl. H-Brücken), so dass sie gut an Glasflächen und anderen Oberflächen adsorbieren. Aufgrund der (relativ) guten Wasserlöslichkeit ist die Anreicherung auf Umkehrphasen schlecht (Bild 35 bzw. Bild 37). Bei der Anreicherung auf Kationentauschern ist im Anschluss ein Abdampfprozess notwendig, der zu einer geringen Wiederfindung führt. Zudem ist die Steigung der Kalibriergeraden selbst bei frisch angesetzten Lösungen eher niedrig (Tabelle 6 bis Tabelle 10 auf Seite 37ff), die geringe Empfindlichkeit der UPLC-MS/MS-Analytik für diese Amine stellt somit eine zusätzliche Herausforderung dar.

Auch o-Tolidin (22) kann zum Chinin-Derivat dehydriert werden (Bild 20) und hat eine flache Molekülstruktur. Die negativen Effekte auf die Analytik sind jedoch weniger ausgeprägt als bei 1,4-Phenylendiamin und 1,5-Naphthalendiamin (22; Bild 38).

Die Wiederfindung der wasserlöslichen aromatischen Amine 1,3-Phenylendiamin (3), 2,6-TDA (9) und 2,4-TDA (10) bei der Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase ist sehr gering (Bild 35 bzw. Bild 36). Die Festphasenextraktion mit Kationentauschern mit 1 M Isopropylamin in Methanol als Elutionsmittel führt zu einer Wiederfindung von etwa 60 %. Bei einer Aufkonzentrierung um Faktor 25 können bei den drei Aminen Bestimmungsgrenzen unterhalb des analytischen Zielwertes erreicht werden (Tabelle 10).

Die Wiederfindung bei Anilin (1; Bild 35), d5-Anilin (26; Bild 39) und liegt bei der Extraktion auf einer Umkehrphase bei etwa 40 bis 60 %. Die Festphasenextraktion auf einem Kationentauscher kann ebenfalls eingesetzt werden, die Wiederfindung ist jedoch etwas schlechter als bei Verwendung der Umkehrphase, sie liegt bei etwa 30 bis 50 %. Bei Anilin treten beim Einengen Verluste auf; bei d5-Anilin ebenfalls, aber in geringerem Maße.

Die Wiederfindung bei den Chloranilin-Derivaten 4-Chloranilin (11; Bild 36), 3-Chlor-2-methylanilin (14; Bild 37) und 5-Chlor-2-methylanilin (15; Bild 37) ist bei Verwendung der Umkehrphasenextraktion etwas besser als bei der Extraktion mit Kationentauscher. Beide Methoden führen jedoch zu guten Resultaten.

Neben den bereits genannten 11 aromatischen Aminen wurden 9 weitere aromatische Amine untersucht: 2,6-Dimethylanilin (6; Bild 35), 2,4-Dimethylanilin (7; Bild 36), N,N-Dimethylanilin (8; Bild 36), 2,4,5-Trimethylanilin (12; Bild 36), 4,4'-MDA (20; Bild 38), 4,4'-Oxydianilin (21; Bild 38), 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminobiphenyl (22; Bild 38), 4,4'-Diaminodiphenylsulfid (23; Bild 38), 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan (24; Bild 38) und 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) (25; Bild 39). Bei diesen Aminen führen beide Anreicherungsverfahren zu einer sehr hohen Wiederfindung.

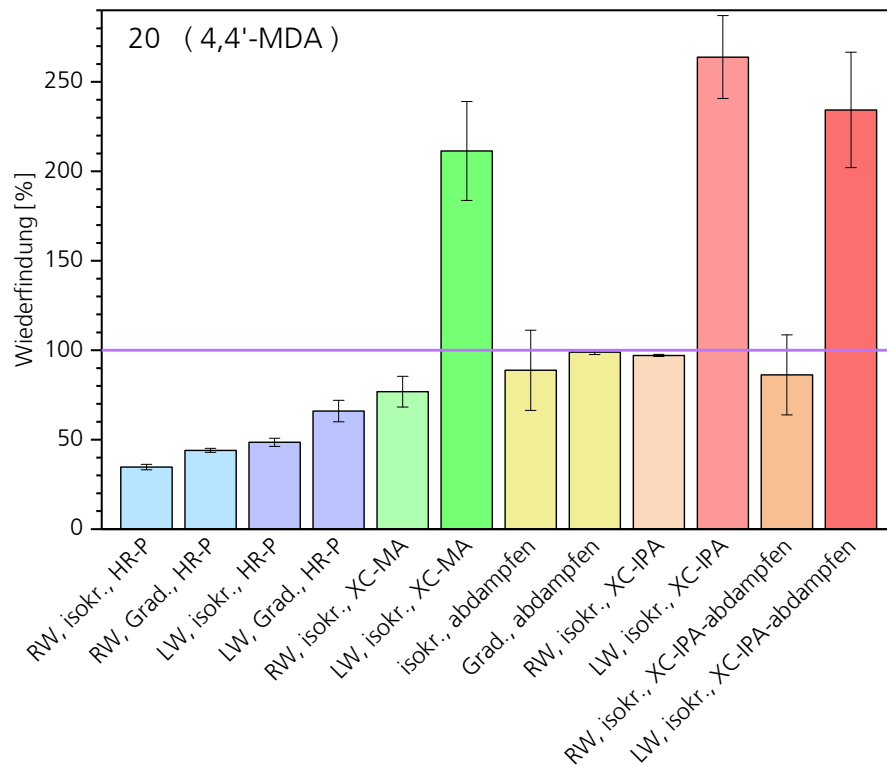


Bild 34:

Vergleich der Festphasenextraktionen bei Amin Nr. 20: 4,4'-MDA.

HR-P = SPE-Umkehrphase; XC = SPE-Kationentauscher; MA = Methylamin; IPA = Isopropylamin; isokr. = isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-Methode; RW = Reinstwasser; LW in Kombination mit HR-P = Leitungswasser; LW in Kombination mit XC = Fraktionsmischung aus Inversem Säulenversuch mit Harz A und kurzer Mischkammer (enthält bereits ca. 20 µg/L 4,4'-MDA); abdestillieren = Einengen des SPE-Eluats, Abdampfen des IPA und Ersetzen des Lösungsmittels von Methanol zu LSM-Mischung B.

Die Zuordnung bzw. Benennung und Farbcodierung bei den folgenden Bildern (Bild 35 bis Bild 39) ist analog zu Bild 34.

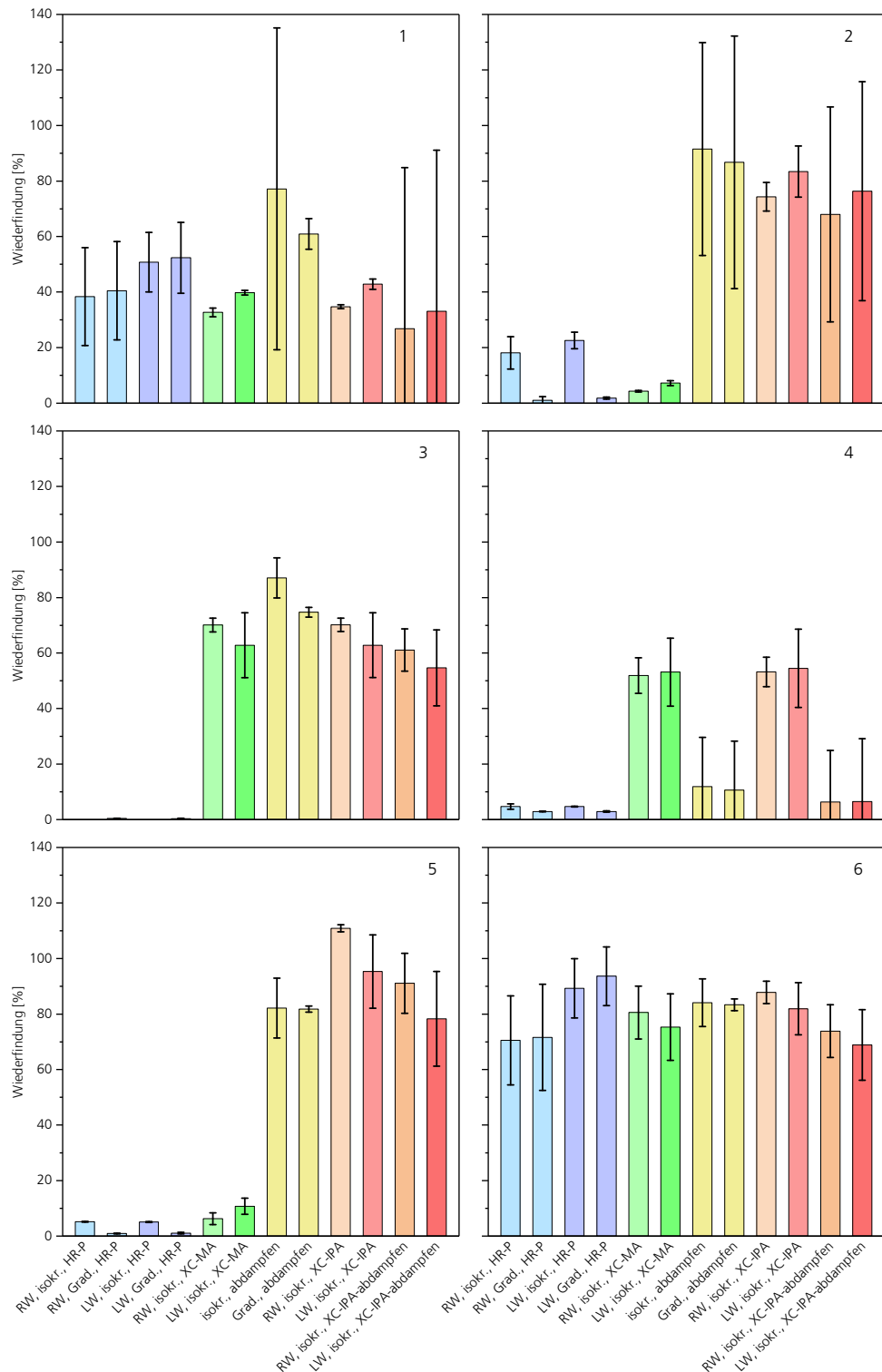


Bild 35:
 Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 1 bis 6. 1: Anilin,
 2: Cyclohexylamin, 3: 1,3-Phenylendiamin, 4: 1,4-Phenylendiamin,
 5: 1,4-Cyclohexandiamin, 6: 2,6-Dimethylanilin.

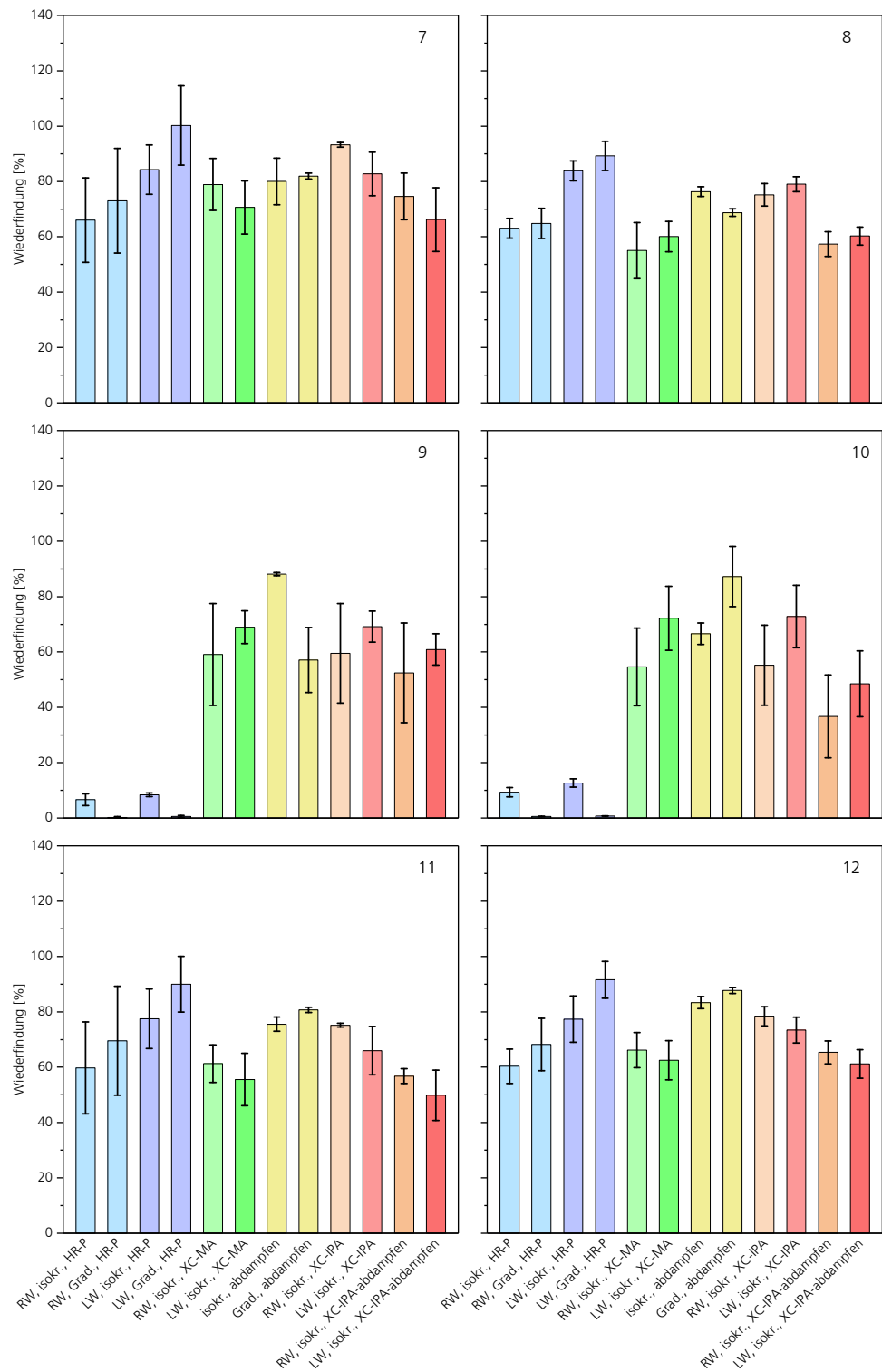


Bild 36:
 Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 7 bis 12.
 7: 2,4-Dimethylanilin, 8: N,N-Dimethylanilin, 9: 2,6-Diaminotoluol (TDA),
 10: 2,4-Diaminotoluol (TDA), 11: 4-Chloranilin, 12: 2,4,5-Trimethylanilin.

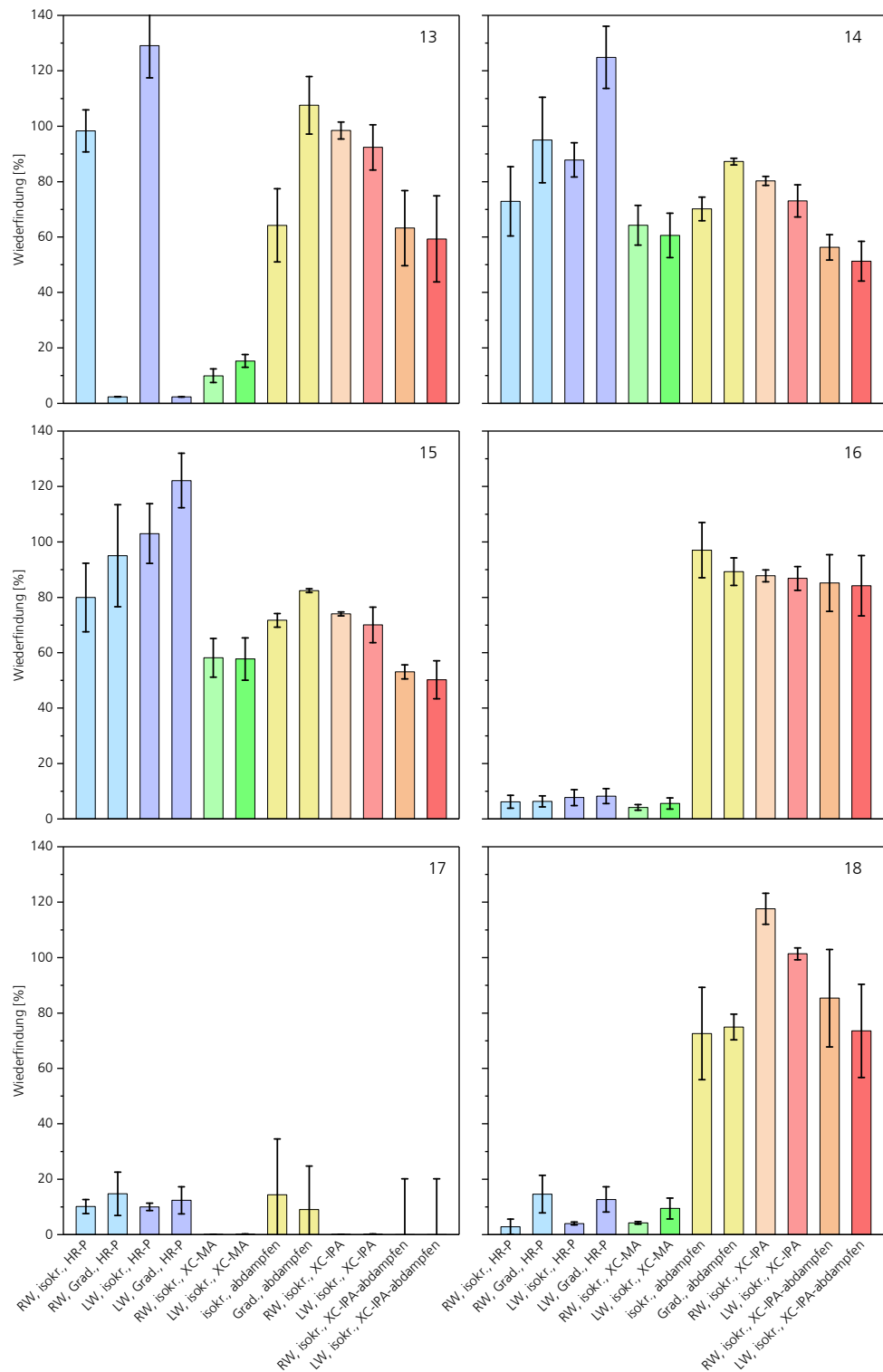


Bild 37:

Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 13 bis 18.

13: 1,3-Benzendimethanamin, 14: 3-Chlor-2-methylanilin, 15: 4-Chlor-2-

methylanilin, 16: 2-Phenylimidazol, 17: 1,5-Naphthalendiamin,

18: Mischung aus 1,6-Diamino-2,2,4-trimethylhexan und 1,6-Diamino-2,4,4-

trimethylhexan.

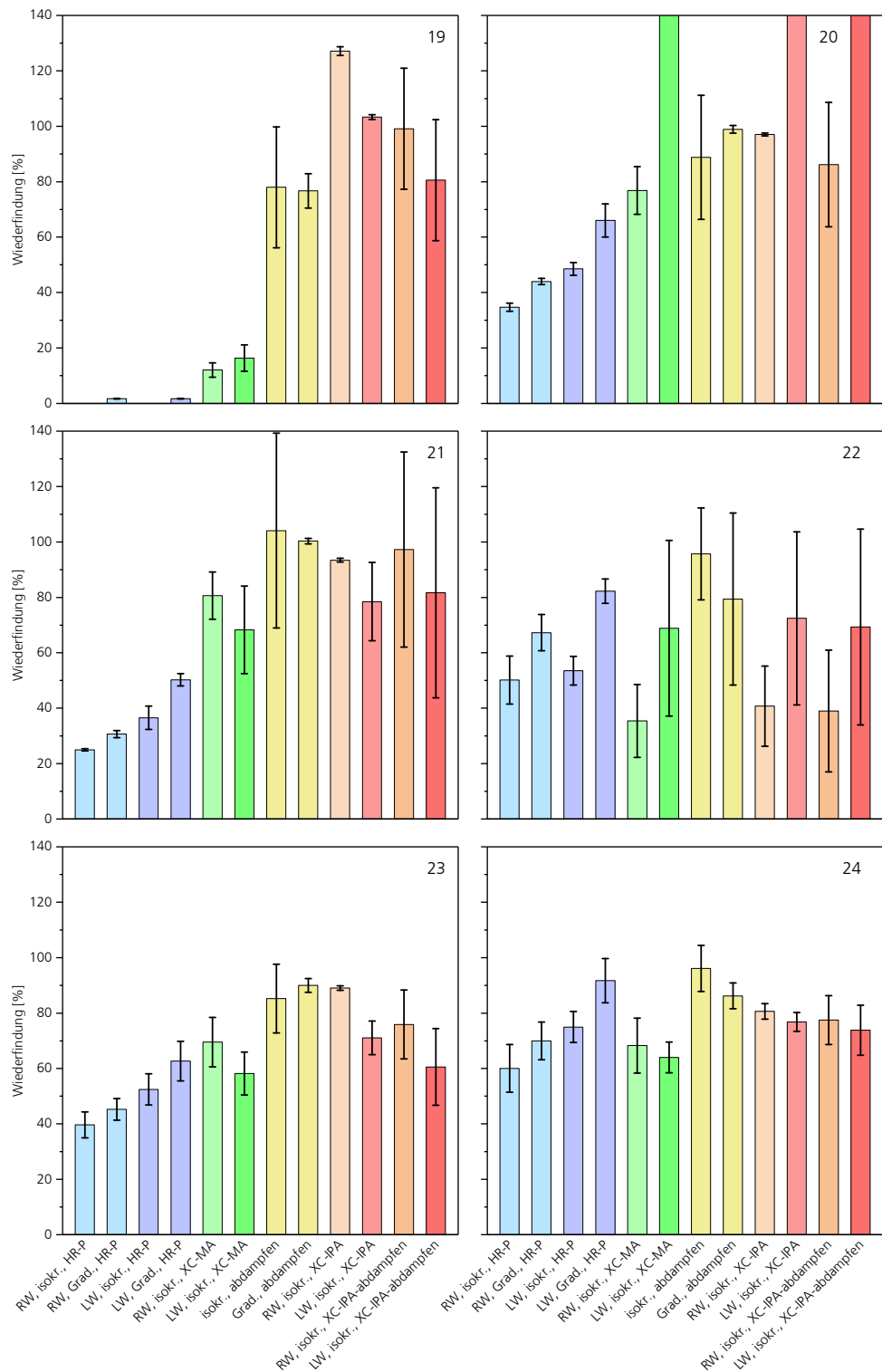


Bild 38:

Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 19 bis 24.

19: Isophorondiamin, 20: 4,4'-MDA, 21: 4,4'-Oxydianilin, 22: o-Tolidin,

23: 4,4'-Diaminophenylsulfid, 24: 3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan.

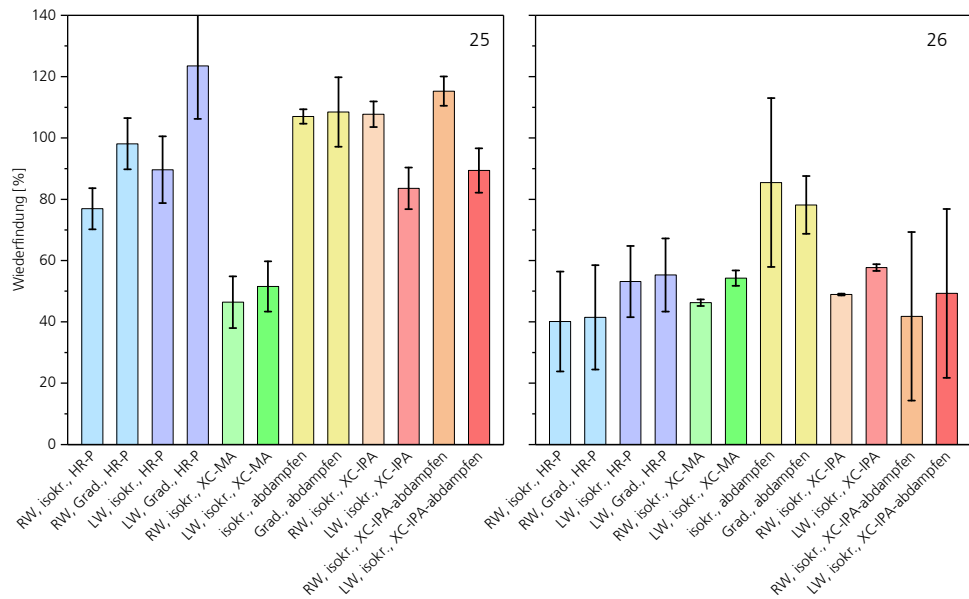


Bild 39:
Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 25 und 26.
25: 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin), 26: d5-Anilin.

Alle untersuchten stabilen aromatischen und aliphatischen Amine konnten auf der CHROMABOND® HR-XC-Kartusche (Machery & Nagel GmbH & Co. KG, Düren) effektiv gebunden werden.

4.4 Amin-Freisetzung aus Polyurethanharzen (PUR)

4.4.1 PUR-Injektionsharz-Elution in Projektphase II

In die mit einer Feinsand-Wasser-Mischung gefüllte Inverse Säule wurden 400 mL PUR-Harz injiziert. Als ISV-Elutionsmittel wurde in Phase II verdünntes Leitungswasser bzw. eine Mischung von 10 L Leitungswasser und 40 L Reinstwasser eingesetzt. Die Elutionsdauer betrug 3,6 h bei einem Volumenstrom von 3,6 L/h. Die Zuordnung der Proben und des Durchflussvolumens (durch Gewichtsbestimmung ermittelt) zu den Fraktionen ist in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11:
Zuordnung der Fraktionen und SPE-Proben beim Inversen Säulenversuch.

Fraktion Nr.	Zeit [h]	Vo-lumen [L]	Probe Nr.	Beschreibung
10	1,0	5,2	P0	Blindwert-Probe; Messpunkt bei 5,2 L
11	1,1	5,5		
12	1,2	5,9		
13	1,3	6,2		
14	1,4	6,6		
15	1,5	7,0		
16	1,6	7,3		
17	1,7	7,7		
18	1,8	8,1		
19	1,9	8,4		
20	2,0	8,8	P2	Probe zum Messpunkt bei 8,8 L
21	2,1	9,1	A*	für Fraktions-Mischung
22	2,2	9,5	P3	Probe zum Messpunkt bei 9,5 L
23	2,3	9,9	A*	für Fraktions-Mischung
24	2,4	10,2	P4	Probe zum Messpunkt bei 10,2 L
25	2,5	10,6	A*	für Fraktions-Mischung
26	2,6	11,0	P5	Probe zum Messpunkt bei 11,0 L
27	2,7	11,3	A*	für Fraktions-Mischung
28	2,8	11,7	P6	Probe zum Messpunkt bei 11,7 L
29	2,9	12,0	A*	für Fraktions-Mischung
30	3,0	12,4		
31	3,1	12,8	P7	Probe zum Messpunkt bei 12,8 L
32	3,2	13,2		
33	3,3	13,5		
34	3,4	13,8		
35	3,5	14,2	P8	Probe zum Messpunkt bei 14,2 L

* die Fraktions-Mischung wurde für eine Standardaddition eingesetzt

Der entstandene Probekörper (Bild 40) hat ein Gewicht von 2.070 g und ein Volumen von 1018 ± 20 mL. Die Dichte von $2,05 \pm 0,04$ g/mL ist um 4 % höher als die des Sand-Wasser-Gemisches [Sch16].



Bild 40:
Probekörper, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer entstand. Oben links: Blick von oben in die Inverse Säule; oben rechts: Blickrichtung von oben; unten links und rechts: Blickrichtung von der Seite.

Um zu klären, ob das Ansäuern der Probe das Ergebnis in Bezug auf die MDA-Konzentration verfälscht bzw. beeinflusst, wurden den Fraktionen vor und nach dem Ansäuern Proben entnommen und direkt im Anschluss mit UPLC-MS/MS auf 4,4'-MDA untersucht. In den Chromatogrammen tauchte bei den Massenübergängen $199 > 106$ und $199 > 183$ ein zweiter Peak auf, der 2,4'-MDA zugeordnet wurde (da kein 2,4'-MDA als Kalibrierstandard zur Verfügung steht, bleibt dies eine Annahme).

In Bild 41 sind die Verläufe für 4,4'-MDA und 2,4'-MDA gezeigt. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe für die angesäuerten und die nicht angesäuerten Proben sind qualitativ identisch und die Konzentrationen sind quantitativ in ähnlicher Höhe. Die Konzentrationen in den neutralen Proben sind sogar etwas höher als in den angesäuerten Proben. Die neutralen Proben wurden direkt im Anschluss an den Inversen Säulenversuch gemessen, die angesäuerten Proben 11 Stunden später.

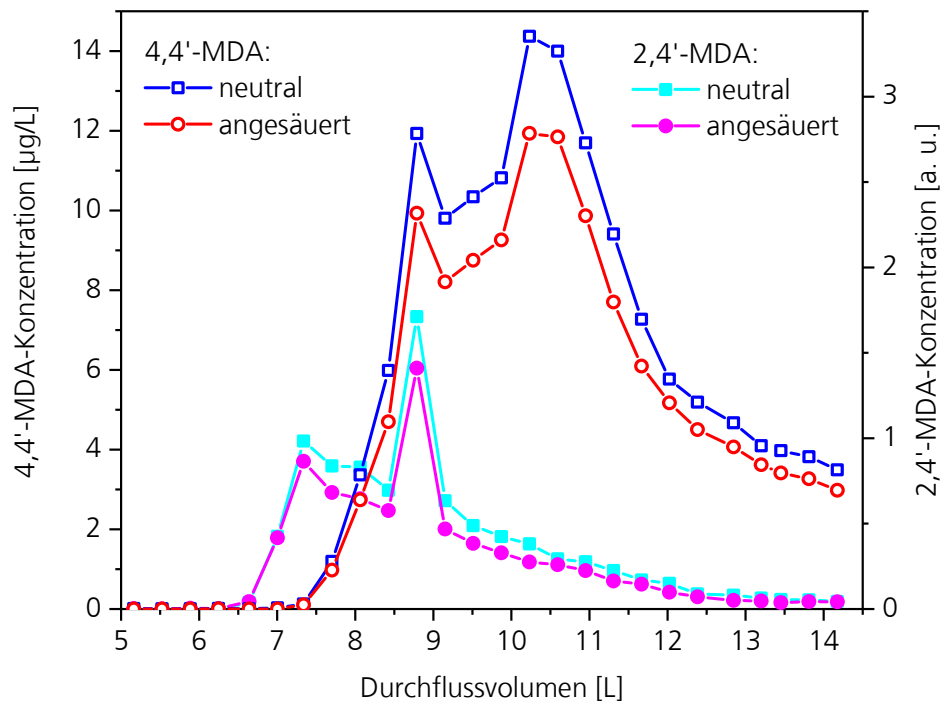


Bild 41:

Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A(2) mit der kurzen Mischkammer entstand (Fluss: 3,6 L/h): blau: 4,4'-MDA in neutraler Probe; rot: 4,4'-MDA in angesäuerter Probe; cyan: 2,4'-MDA in neutraler Probe; magenta: 2,4'-MDA in angesäuerter Probe.

In Bild 41 ist zu erkennen, dass ab 6,6 L Durchflussvolumen die 2,4'-MDA-Konzentration innerhalb von 12 min auf ein Maximum ansteigt (bei 7,3 L) und dann innerhalb von 2 h langsam auf null abfällt (bei 13 L). In der Elutions-Fraktion Nr. 20 (bei 8,8 L) ist einmalig eine sehr hohe 2,4'-MDA-Konzentration enthalten.

Die 4,4'-MDA-Konzentration steigt erst ab 7,3 L Durchflussvolumen an und durchläuft ebenfalls zwei Maxima. Die höchste 4,4'-MDA-Konzentration wird mit 14 µg/L in der Elutions-Fraktion Nr. 24 bei 10,2 L Durchflussvolumen erreicht. In der Elutions-Fraktion Nr. 20 (bei 8,8 L) ist einmalig eine sehr hohe 4,4'-MDA-Konzentration enthalten, sie liegt bei 12 µg/L.

In Fraktion Nr. 20, bei 8,8 L Durchflussvolumen, weisen beide Isomere gleichzeitig einen kurzen, starken Konzentrationsanstieg auf. 2,4'-MDA hat ein zweites Konzentrationsmaximum vor dieser Fraktion, 4,4'-MDA dagegen nach dieser Fraktion. Die Freisetzung von 2,4'-MDA erfolgt bereits 0,7 L bzw. 12 min. früher als die von 4,4'-MDA. Nach 3,5 h bzw. 14 L ist die 2,4'-MDA-Konzentration bereits wieder auf null abgefallen, während die 4,4'-MDA-Konzentration zu diesem Zeitpunkt noch bei 4 µg/L liegt. 2,4'-MDA wird demnach früher und schneller aus dem PUR-Harz freigesetzt als 4,4'-MDA.

Die Proben P0, P2 bis P8 und die Standardadditionslösungen A0 bis A7 wurden einer XC-SPE unterzogen und das Isopropylamin wurde abgedampft. Die

Kontrolle des Isopropyl-Restgehaltes mit Bromthymolblau ergab, dass die Grünfärbung auch nach mehrfach wiederholtem Einengen nicht verschwindet. Die Grünfärbung der Proben P2 (8,8 L), P3 (9,5 L) und P4 (10,2 L) sind in Bild 42 deutlich zu erkennen. Die maximale Grünfärbung liegt bei P2 vor; dies ist die Fraktion (Nr. 20), in der sowohl 2,4'-MDA als auch 4,4'-MDA ein Konzentrationsmaximum aufweisen. Auch bei den Fraktionsmischungen A0 bis A7 ist die Grünfärbung zu erkennen (Bild 43).

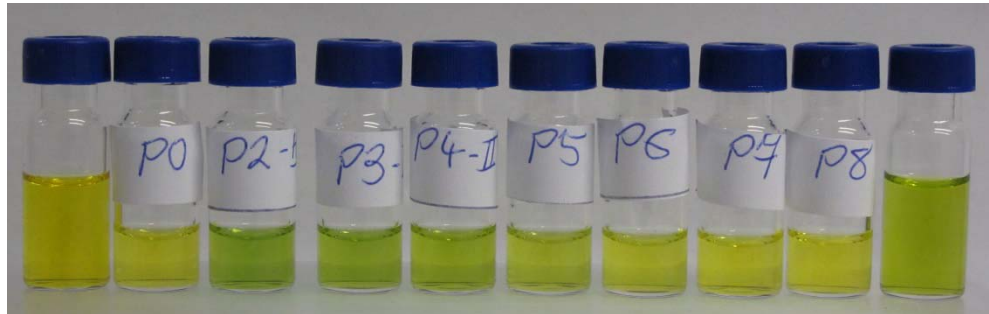


Bild 42:
Kontrolle des pH-Wertes mit Bromthymolblau in Methanol. Ganz links: 0 mM Isopropylamin; ganz rechts: 2 mM Isopropylamin; dazwischen: Fraktionen P0 und P2 bis P8 (s. Tabelle 11).

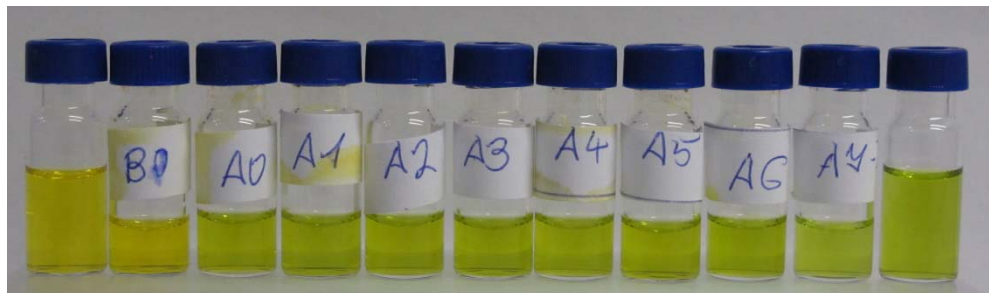


Bild 43:
Kontrolle des pH-Wertes mit Bromthymolblau in Methanol. Ganz links: 0 mM Isopropylamin; ganz rechts: 2 mM Isopropylamin; dazwischen: Mischfraktionen A0 bis A7 (s. Tabelle 11).

Die Färbung in den Proben A0 bis A7 entspricht einer molaren Amin-Konzentration von 0,08 mmol/L und damit einer Konzentration von 2 mmol/L im SPE-Eluat bzw. von 16 $\mu\text{mol/L}$ im ISV-Eluat. Eine 4,4'-MDA-Konzentration von 14 $\mu\text{g/L}$ entspricht einer molaren Konzentration von 0,07 $\mu\text{mol/L}$. Demnach ist die Amingruppen-Konzentration um das 230-fache höher als die 4,4'-MDA-Konzentration.

Die im Jahr 2017 im Inversen Säulenversuch gewonnenen ISV-Eluate enthielten noch mehr Matrix als die im Jahr 2015 gewonnenen ISV-Eluate. Die These bzw. Annahme, dass die störenden Matrixbestandteile durch SPE mit Kationentauscher (XC-SPE) von den interessierenden Aminen abgetrennt werden

können, stellte sich als falsch heraus. Durch die XC-SPE (Anreicherungsfaktor: 125) werden in großen Mengen unbekannte Amine angereichert, die die Chromatographie massiv stören. Die Chromatogramme waren nicht auswertbar; selbst durch Standardaddition und Verdünnungsreihen konnten keine verwertbaren UPLC-MS/MS-Daten generiert werden.

4.4.2 Vergleich mit Projektphase I

Das in Phase II des Projektes eingesetzte Harz A wurde bereits in Phase I eingesetzt. Im November 2015 konnte im ISV-Eluat der Säule, in die das Harz A mit der kurzen Mischkammer injiziert wurde, 4,4'-MDA-Konzentrationen von bis zu 25 µg/L 4,4'-MDA nachgewiesen werden. Der Probekörper (Bild 44) hat ein Gewicht von 1.832 g und ein Volumen von 1.004 ± 10 mL. Die Dichte von $1,82 \pm 0,04$ g/mL ist um 8 % geringer als die des Sand-Wasser-Gemisches (Kap.3.4.1).



Bild 44:
Probekörper, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer im November 2015 entstand.

Die mit Phosphorsäure angesäuerten Probelösungen waren bei pH 2 über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen stabil. Eine Mischung aus mehreren Fraktionen mit einer durchschnittlichen 4,4'-MDA-Konzentration von etwa 10 µg/L wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und in Phase II des Projektes für die Festphasenextraktionen verwendet. Bei der Festphasenextraktion mit Kationentauscher im August 2017 wurden etwa 150 µg/L ermittelt, also eine 15-mal höhere 4,4'-MDA-Konzentration als 21 Monate zuvor. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass 4,4'-MDA in Wasserproben bei pH 2 über Jahre stabil ist. Zum anderen ist es ein Hinweis darauf, dass in der Mischfraktion Oligokondensate enthalten waren, die in der Zwischenzeit hydrolysiert sind und 4,4'-MDA freisetzen.

In Bild 45 sind zum Vergleich der zeitliche 4,4'-MDA-Konzentrationsverlauf aus dem Inversen Säulenversuch aus dem Jahr 2015 sowie die Ergebnisse des

Versuchs vom Februar 2018 dargestellt. Sowohl die Form des Verlaufs als auch die Höhe der 4,4'-MDA-Konzentration sind ähnlich.

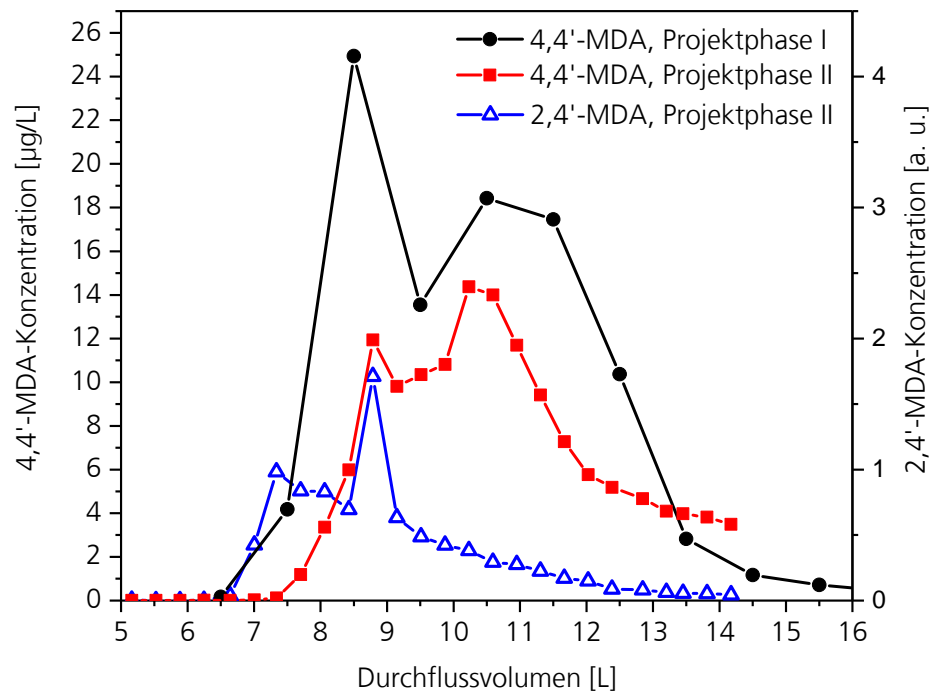


Bild 45:
4,4'-MDA und 2,4'-MDA-Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer entstand. Vergleich eines Inversen Säulenversuchs vom November 2015 (blau) und vom Februar 2018 (rot).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Experimenten liegt in der Intensität des Matrixeffektes. Der offensichtlichste Unterschied ist die Art des ISV-Eluenten: Im Jahr 2015 wurde direkt Leitungswasser eingesetzt, im Jahr 2018 wurde Leitungswasser mit Reinstwasser um Faktor 5 verdünnt. Eine Verringerung des Salz- und Kieselsäuregehalts kann die Ursache für die stärkere Freisetzung von Matrixbestandteilen sein.

Literatur

- [Ame13] Ismael Amer, Desmond Austin Young: „Chemically oxidative polymerization of aromatic diamines: The first use of aluminium-triflate as a co-catalyst“; *Polymer* 54 (2013); S. 505–512
- [Azn09] Margarita Aznar, Elena Canellas, Cristina Nerín: „Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry“; *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009); S.5176–5181
- [Cha09] D.K. Chattopadhyay, Dean C.Webster: „Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes“; *Progress in Polymer Science* 34 (2009); S. 1068–1133
- [Gar10] J. García-Lavandeira, C. Salgado-Petinal, E. Blanco, R. Cela: „A sensitive and efficient procedure for the high throughput determination of banned aromatic amines in textiles and leather products aided by advanced sample composition“; *Anal Bioanal Chem* 397 (2010); S. 751–763
- [Hai14] Xiao Hailong et al.: „A Rapid and Sensitive Method for the Detection of Aromatic Amines in Cosmetics“; *Journal of Chromatographic Science* 52 (2014); S. 115–119
- [Joh10] Jakob Riddar Johnson, Daniel Karlsson, Marianne Dalene, Gunnar Skarping: „Determination of aromatic amines in aqueous extracts of polyurethane foam using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry“; *Analytica Chimica Acta* 678 (2010); S. 117–123
- [Leß01] Melanie Leß: „Bestimmung aromatischer Amine mit On-line-SPE/HPLC sowie mit GC/ECD nach Derivatisierung“; Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie (2001)
- [Li10] Ruiping Li, Yi Zhang, Charles C. Lee, Rongrong Lu, Yingping Huang: „Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatographic method for determination of aromatic amines in environmental water“; *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010); S. 1799–1805
- [Mei00] Daniel Meinzer: „Aromatische Amine im Grundwasser einer Gaswerksaltlast: Identifizierung, Bestimmung und Bedeutung“; Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie (2000)

- [Mor05] Sarah Kelly Mortensen, Xenia Thorsager Trier, Annie Foverskov, Jens Højslev Petersen: „Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry“; *Journal of Chromatography A*, 1091 (2005); S. 40–50
- [Sah09] Subhrakanti Saha, Rajib Mistri, B.C. Ray: „Rapid and sensitive method for simultaneous determination of six carcinogenic aromatic amines in mainstream cigarette smoke by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry“; *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009); S. 3059–3063
- [San11] Tomofumi Santa: „Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry“; *Biomedical Chromatography* 25 (2011); S. 1–10
- [Sch11] Jens Schubert, Oliver Kappenstein, Andreas Luch, Thomas G. Schulz: „Analysis of primary aromatic amines in the mainstream waterpipe smoke using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry“; *Journal of Chromatography A* 1218 (2011); S. 5628–5637
- [Sch13] Thomas Schupp: „Modeling formation and distribution of toluene-2,4-diamine after spillage of toluene-2,4-diisocyanate into a river“; *Journal of Hazardous Materials* 252–253 (2013); S. 70–76
- [Sch16] Andreas Schmohl, Christian Scherer: „Freisetzung von Isocyanaten und Aminen aus Bauwerksabdichtungen - Erarbeitung eines Verfahrens zur analytischen Quantifizierung als Grundlage für die Bewertung im Rahmen der abZ“; *Bauforschung*, Band T 3343, Fraunhofer IRB Verlag (2016), 82 Seiten; ISBN 978-3-8167-9853-8; DIBt-Fördernummer: P 52-5-20.85.1
- [Sch17] Andreas Schmohl, Christian Scherer: „Freisetzung von aromatischen Aminen aus PUR-Injektionsharzen zur Bauwerksabdichtung“; *Tagungsband zur Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft „Wasser 2017“ vom 22. - 24.05.2017 in Donaueschingen*; S. 518–523
- [Sut05] P. Sutthivaiyakit, S. Achatz, J. Lintelmann, T. Aungpradit, R. Chanwirat, S. Chumanee, A. Kettrup: „LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis“; *Anal Bioanal Chem* 381 (2005); S. 268–276
- [Wag11] Robert Wagner: „Inverser Säulenversuch zur Beurteilung der Auswirkungen von Bodeninjektionsmitteln auf Boden und Grundwasser“; *Dissertation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Geowissenschaften* (2011)

Bildverzeichnis

Bild 1:	Strukturformeln der Amine mit molarer Masse < 140 g/mol.	13
Bild 2:	Strukturformeln der Amine mit molarer Masse >140 g/mol.	14
Bild 3:	Elution des injizierten PUR-Harzes in Inverser Säule. Füllung: Frechener Feinsand, 0 – 1 mm. Injiziertes Harzvolumen: 400 mL.	16
Bild 4:	Inverser Säulenversuch. Oben: Injektion des PUR-Harzes. Unten: Umspülung des Probekörpers mit Leitungswasser und Auffangen des Eluats. Fluss: 3,6 L/h; Fraktionsvolumen: 360 mL (entspricht 6 min). Eine ausführlichere Beschreibung der Versuchsdurchführung ist im Anhang des Abschlussberichtes der ersten Projektphase enthalten [Sch16].	17
Bild 5:	Eingesetzte „kurze“ Mischkammer.	18
Bild 6:	Chromatographische Eigenschaften von Aminen mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften am Beispiel von 6 Aminen.	21
Bild 7:	Einfluss der Laufmittelzusammensetzung auf die Laufzeit der 26 untersuchten Amine (ohne Zuordnung zu den einzelnen Aminen). Die rote Linie markiert die Laufmittelzusammensetzung der isokratischen Methode.	22
Bild 8:	Acetonitril / Wasser-Gradient. Beide Komponenten enthalten 0,02 Vol.-% Ameisensäure.	23
Bild 9:	Chromatographische Eigenschaften der untersuchten Amin-Isomere.	24
Bild 10:	Chromatogramme bei isokratischer Methode.	26
Bild 11:	Chromatogramme bei Gradienten-Methode.	28
Bild 12:	Chromatographische Trennung von 1,3-Phenylendiamin und 1,4-Phenylendiamin.	29
Bild 13:	Chromatographische Trennung von 2,6-TDA und 2,4-TDA.	29
Bild 14:	Chromatographische Trennung von 2,6-Dimethylanilin (2,75/6,57), 2,4-Dimethylanilin (3,35/6,13) und N,N-Dimethylanilin (2,95/3,76). Massenübergang 122 > 107	29
Bild 15:	Chromatographische Trennung von 2,6-TDA (2,25/2,01), 2,4-TDA (2,48/1,57), 2,6-Dimethylanilin (2,75/6,57), 2,4-Dimethylanilin (3,35/6,13) und N,N-Dimethylanilin (2,95/3,77). Massenübergang 123 > 108.	30
Bild 16:	Chromatographische Trennung von 3-Chlor-2-methylanilin und 4-Chlor-2-methylanilin.	30

Bild 17: Vergleich der Steigung der Kalibriergerade bei Gradienten-Methode und isokratischer Methode für 11 stabile Amine mit hoher Empfindlichkeit absteigend sortiert nach Gradienten-Methode.	31
Bild 18: Vergleich der Steigung der Kalibriergerade bei Gradienten-Methode und isokratischer Methode für 11 stabile Amine mit geringer Empfindlichkeit absteigend sortiert nach Gradienten-Methode.	31
Bild 19: Verhältnis der Empfindlichkeit der isokratischen Methode zur Gradienten-Methode $\{y = (\text{misokr.} / \text{mGrad.} - 1) \times 100\}$. Gezeigt sind nur Abweichungen über 15 %.	32
Bild 20: Besonders leicht oxidierbare Amine vor und nach der Oxidation/Dehydrierung: a) 1,4-Phenylendiamin, b) 1,5-Naphthalendiamin und c) o-Tolidin.	42
Bild 21: Wiederfindung für die 26 untersuchten Amine bei Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase (CHROMABOND® HR-P). RW = Reinstwasser; LW = Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase; isokr. = isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-Methode.	44
Bild 22: Aminkonzentrationen in der Lösung für die Festphasenextraktion.	45
Bild 23: Wiederfindung für die 6 aliphatischen Amine mit 2 verschiedenen Elutions-Lösungen: Links: 1 M Isopropylamin in Methanol, Rechts: 1 M Methylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa) bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (grau).	46
Bild 24: Wiederfindung für die 17 stabilen aromatischen Amine. Elutionslösung: 1 M Methylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa, 2x) bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (grau, 2x). Letztere Proben enthalten bereits 4,4'-MDA (100 % 4,4'-MDA entspricht 28 µg/L).	47
Bild 25: Wiederfindung für die 17 stabilen aromatischen Amine. Elutionslösung: 1 M Isopropylamin in Methanol. Als Probe diente Reinstwasser (rosa, 2x) bzw. eine Mischung von Fraktionen eines Inversen Säulenversuchs aus der ersten Projektphase (grau, 2x). Letztere Proben enthalten bereits 4,4'-MDA (100 % 4,4'-MDA entspricht 28 µg/L).	48
Bild 26: Kontrolle des pH-Wertes bzw. der molaren Amin-Konzentration mit Bromthymolblau in Methanol. Von links nach rechts: 0 mM, 0,08 mM, 0,4 mM, 2 mM, 8 mM, 40 mM Isopropylamin.	50
Bild 27: Vergleich der Wiederfindung beim Einengen bzw. Abdampfen des SPE-Elutionsmittels und Ersetzen des Lösungsmittels von	

- Methanol zu LSM-Mischung B bei 4,4'-MDA (Amin Nr. 20).
 IPA = Isopropylamin; EMA = N,N-Ethylmethylamin; isokr. =
 isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-
 Methode; Verlust: vor dem Abdampfen zugegebener Standard;
 Suppr.: Signalunterdrückung durch Matrixeffekte bei nach dem
 Abdampfen zugegebenen Standard. 51
- Bild 28: Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungs-
 mittels und ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisen-
 säure. 20: 4,4'-MDA; 21: 4,4'-Oxydianilin; 24: 3,3'-Dimethyl-
 4,4'-diaminodiphenylmethan; 25: 4,4'-Methylen-bis-(2-
 chloranilin); 6: 2,6-Dimethylanilin; 7: 2,4-Dimethylanilin. 52
- Bild 29: Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungs-
 mittels und ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisen-
 säure. 12: 2,4,5-Trimethylanilin; 13: 1,3-Benzendimethanamin;
 23: 4,4'-Diaminophenylsulfid; 8: N,N-Dimethylanilin;
 16: 2-Phenylimidazolin; 19: Isophorondiamin. 53
- Bild 30: Vergleich der Wiederfindung beim Abdampfen des Lösungs-
 mittels und ersetzen durch Acetonitril und verdünnte Ameisen-
 säure. 22: o-Tolidin; 26: d5-Anilin; 14: 3-Chlor-2-methylanilin;
 15: 4-Chlor-2-methylanilin; 5: 1,4-Cyclohexandiamin;
 18: Mischung aus 1,6-Diamino-2,2,4-trimethylhexan und
 1,6-Diamino-2,4,4-trimethylhexan. 54
- Bild 31: Vergleich der Wiederfindung Vergleich der Wiederfindung beim
 Abdampfen des Lösungsmittels und ersetzen durch Acetonitril
 und verdünnte Ameisensäure. 1: Anilin; 2: Cyclohexylamin;
 3: 1,3-Phenylendiamin; 11: 4-Chloranilin; 9: 2,6-TDA;
 10: 2,4-TDA. 55
- Bild 32: Vergleich der Wiederfindung Vergleich der Wiederfindung beim
 Abdampfen des Lösungsmittels und ersetzen durch Acetonitril
 und verdünnte Ameisensäure. 4: 1,4-Phenylendiamin;
 17: 2,5-Naphthalendiamin. 56
- Bild 33: Vergleich der Amin-Wiederfindung beim Abdampfen des
 Lösungsmittels und ersetzen durch Acetonitril mit
 anschließendem Auffüllen mit verdünnter Ameisensäure. 57
- Bild 34: Vergleich der Festphasenextraktionen bei Amin Nr.
 20: 4,4'-MDA. HR-P = SPE-Umkehrphase; XC = SPE-Kationen-
 tauscher; MA = Methylamin; IPA = Isopropylamin; isokr. =
 isokratische UPLC-Methode; Grad. = Gradient als UPLC-
 Methode; RW = Reinstwasser; LW in Kombination mit HR-P =
 Leitungswasser; LW in Kombination mit XC = Fraktions-
 Mischung aus Inversem Säulenversuch mit Harz A und kurzer
 Mischkammer (enthält bereits ca. 20 µg/L 4,4'-MDA);
 abdampfen = Einengen des SPE-Eluats, Abdampfen des IPA und
 Ersetzen des Lösungsmittels von Methanol zu LSM-Mischung B. 59
- Bild 35: Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 1 bis
 6. 1: Anilin, 2: Cyclohexylamin, 3: 1,3-Phenylendiamin,

4: 1,4-Phenylendiamin, 5: 1,4-Cyclohexandiamin, 6: 2,6-Dimethylanilin.	60
Bild 36: Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 7 bis 12. 7: 2,4-Dimethylanilin, 8: N,N-Dimethylanilin, 9: 2,6-Diaminotoluol (TDA), 10: 2,4-Diaminotoluol (TDA), 11: 4-Chloranilin, 12: 2,4,5-Trimethylanilin.	61
Bild 37: Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 13 bis 18. 13: 1,3-Benzendimethanamin, 14: 3-Chlor-2-methylanilin, 15: 4-Chlor-2-methylanilin , 16: 2-Phenylimidazolin, 17: 1,5-Naphthalendiamin, 18: Mischung aus 1,6-Diamino- 2,2,4-trimethylhexan und 1,6-Diamino-2,4,4-trimethylhexan.	62
Bild 38: Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 19 bis 24. 19: Isophorondiamin, 20: 4,4'-MDA, 21: 4,4'-Oxydianilin , 22: o-Tolidin, 23: 4,4'-Diaminophenylsulfid, 24: 3,3'-Diemthyl- 4,4'-diaminodiphenylmethan.	63
Bild 39: Vergleich der Festphasenextraktionen bei den Aminen Nr. 25 und 26. 25: 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin), 26: d5-Anilin.	64
Bild 40: Probekörper, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer entstand. Oben links: Blick von oben in die Inverse Säule; oben rechts: Blickrichtung von oben; unten links und rechts: Blickrichtung von der Seite.	66
Bild 41: Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A(2) mit der kurzen Mischkammer entstand (Fluss: 3,6 L/h): blau: 4,4'-MDA in neutraler Probe; rot: 4,4'-MDA in angesäuerter Probe; cyan: 2,4'-MDA in neutraler Probe; magenta: 2,4'-MDA in angesäuerter Probe.	67
Bild 42: Kontrolle des pH-Wertes mit Bromthymolblau in Methanol. Ganz links: 0 mM Isopropylamin; ganz rechts: 2 mM Isopropylamin; dazwischen: Fraktionen P0 und P2 bis P8 (s. Tabelle 11).	68
Bild 43: Kontrolle des pH-Wertes mit Bromthymolblau in Methanol. Ganz links: 0 mM Isopropylamin; ganz rechts: 2 mM Isopropylamin; dazwischen: Mischfraktionen A0 bis A7 (s. Tabelle 11).	68
Bild 44: Probekörper, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer im November 2015 entstand.	69
Bild 45: 4,4'-MDA und 2,4'-MDA-Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A mit der kurzen Mischkammer entstand. Vergleich eines Inversen Säulenversuchs vom November 2015 (blau) und vom Februar 2018 (rot).	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der für das Projekt ausgewählten Amine mit Zuordnung zu einer Amin-Nummer (= projektinterne Nummer).	12
Tabelle 2: Massenübergänge der 26 untersuchten Amine.	20
Tabelle 3: Laufzeiten der 26 untersuchten Amine mit isokratischer Methode (s. Ziffer 3.2.1).	25
Tabelle 4: Laufzeiten der 26 untersuchten Amine bei der Gradienten-Methode (s. Ziffer 3.2.1).	27
Tabelle 5: Konzentrationsbereich in [pg/ μ L] der Kalibrierlösungen für die 26 untersuchten Amine in LSM-Mischung B. In beiden Konzentrationsbereichen wurden jeweils 10 Konzentrationen mit äquidistantem Konzentrationsabstand verwendet (z. B. 10, 20, ..., 80, 90, 100).	36
Tabelle 6: Stabilität der untersuchten Amine in LSM-Mischung B: Veränderung der Geradensteigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden (mit $y_0 = 0!$) innerhalb von 3 Tagen im <u>oberen</u> Kalibrierbereich bei Injektion von 5 μ L. Zeit zwischen Herstellung der Kalibrierstandards und Injektion: A: 8 h, B: 34h, C: 75 h.	37
Tabelle 7: Steigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden sowie Bestimmtheitsmaß R^2 der untersuchten Amine in LSM-Mischung B bei Injektion von 5 μ L im <u>oberen</u> Kalibrierbereich. Soweit nicht anders angegeben wurde Messung B (siehe Tabelle 6) eingesetzt und $y_0 = 0!$ verwendet.	38
Tabelle 8: Stabilität der untersuchten Amine in LSM-Mischung B: Veränderung der Geradensteigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden (mit $y_0 = 0!$) innerhalb von 3 Tagen im <u>unteren</u> Kalibrierbereich bei Injektion von 5 μ L. Zeit zwischen Herstellung der Kalibrierstandards und Injektion: A: 5 h, B: 31h, C: 72 h.	39
Tabelle 9: Steigung m' [counts/pg] der Kalibriergeraden sowie Bestimmtheitsmaß R^2 der untersuchten Amine in LSM-Mischung B bei Injektion von 5 μ L im <u>unteren</u> Kalibrierbereich. Soweit nicht anders angegeben wurde Messung B eingesetzt und $y_0 = 0!$ verwendet.	40
Tabelle 10: Kalibrier-Konzentrationen mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) größer gleich 3 bei isokratischer UPLC-Methode und Injektion von 5 μ L ins UPLC-MS/MS-Gerät.	41
Tabelle 11: Zuordnung der Fraktionen und SPE-Proben beim Inversen Säulenversuch.	65