



Andreas Schmohl, Sabine Johann

## **Freisetzung von aromatischen Aminen aus Bauwerksabdichtungen**

Verfahren zur analytischen Quantifizierung als  
Grundlage für die Bewertung im Rahmen der abZ

Andreas Schmohl, Sabine Johann

**T 3394**

## **Freisetzung von aromatischen Aminen aus Bauwerksabdichtungen**

Verfahren zur analytischen Quantifizierung als  
Grundlage für die Bewertung im Rahmen der abZ

T 3394

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

© by Fraunhofer IRB Verlag

2022

ISBN 978-3-7388-0733-2

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](mailto:irb@irb.fraunhofer.de)

[www.baufachinformation.de](http://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-Bericht UHS-051/2021**

**Freisetzung von aromatischen Aminen aus  
Bauwerksabdichtungen**  
**Verfahren 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 52-5-20.99-2049/19

Der Bericht umfasst  
165 Seiten Text  
13 Tabellen  
119 Abbildungen

Dr. Andreas Schmohl  
M. Sc. Sabine Johann

Valley, 30. Juni 2021

Gruppenleiterin

**Sabine  
Johann**

M.Sc. Sabine Johann

 Digital unterschrieben  
von Sabine Johann  
Datum: 2021.06.30  
11:16:43 +02'00'

Bearbeiter

**Andreas Schmohl**

Dr. rer. nat. Andreas Schmohl

 Digital unterschrieben von Andreas  
Schmohl  
Datum: 2021.06.30 10:41:36 +02'00'

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung und Fazit</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Ausgangssituation und Ziele</b>	<b>12</b>
2.1	Ausgangssituation	12
2.2	Ziele des Forschungsvorhabens	13
<b>3</b>	<b>Methodik</b>	<b>14</b>
3.1	Untersuchungsumfang Amine	14
3.2	Instrumentelle Analytik	18
3.3	Methodenvalidierung	18
3.4	Injektionsharz-Eluate aus inversen Säulenversuchen (ISV)	20
3.5	Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS	21
3.6	Produktscreening und Zeitverlauf im ISV	23
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>24</b>
4.1	Instrumentelle Analytik und Methodenvalidierung	24
4.1.1	Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)	24
4.1.2	Flüssigchromatographie (UPLC)	25
4.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	27
4.1.4	Messsignalstabilität (QC-Verlauf)	40
4.1.5	2,4-Diaminoanisol (A09), Benzidin (A15) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18)	45
4.1.6	Stabilität der Stammlösungen	53
4.2	Methodenvergleich GC-MS vs. UPLC-MS/MS	54
4.2.1	Amine in Reinstwasser	54
4.2.2	Amine in ISV-Eluaten	63
4.3	Produktscreening und Zeitverlauf im ISV	69
4.3.1	Eluate ohne Zusatz (Transport und Lagerung)	69
4.3.2	Vergleich neutrale vs. angesäuerte Eluate (Transport und Lagerung)	73
<b>5</b>	<b>Ergebniszusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>78</b>
<b>A.1</b>	<b>Anhang 1: Kalibrierung (0,01 bis 1,8 µg/L)</b>	<b>81</b>
<b>A.2</b>	<b>Anhang 2: Stabilität der Stammlösungen</b>	<b>89</b>

<b>A.3</b>	<b>Anhang 3: Wiederfindung in den Reinstwasserproben für den Methodenvergleich im Vergleich zu direkt vor der Analyse frisch angesetzten Lösungen</b>	<b>97</b>
<b>A.4</b>	<b>Anhang 4: Kalibrierung für Methodenvergleich</b>	<b>101</b>
<b>A.5</b>	<b>Anhang 5: Methodenvergleich (Amine einzeln)</b>	<b>111</b>
<b>A.6</b>	<b>Anhang 6: Vergleich angesäuertes vs. neutrales Eluat aus Projektphase II</b>	<b>121</b>
<b>A.7</b>	<b>Anhang 7: Während des Forschungsvorhabens verwendete Verfahrensbeschreibung</b>	<b>122</b>
<b>1</b>	<b>Vorbereitung</b>	<b>122</b>
1.1	Lösungsmittelmischungen und verdünnte Säuren	122
1.1.1	Verdünnte Ameisensäure	122
1.1.2	Laufmittel A und B	122
1.1.3	Mischung A, B und C	122
1.1.4	Mischung Sg, Si, Ng und Ni	123
1.2	Ansetzen der Stammlösungen	124
1.3	Verdünnungsreihen für die Kalibrierung	126
1.4	Lösung SA	132
<b>2</b>	<b>Durchführung</b>	<b>134</b>
2.1	Allgemeine Vorgehensweise	134
2.2	Durchführung der Probenahme	136
2.3	Filtrierung der Proben	136
2.4	Probenvorbereitung für den Vortest (V)	136
2.5	Probenvorbereitung für den Matrixtest (M)	137
2.6	Probenvorbereitung für die Spurenanalyse (S)	137
2.7	Standardadditionsverfahren (A)	138
2.8	Injektionsvolumen	139
2.9	Analysensequenz	139
2.9.1	Grobe Kalibrierung	139
2.9.2	Feine Kalibrierung	139
2.9.3	Qualitätssicherung	140
2.9.4	Blindwerte	140
2.9.5	Vortest-Sequenz	140
2.9.6	Sequenz für Matrixtest, Spurenanalyse und Standardadditionsverfahren	141
2.10	Berechnung der Konzentrationen in den Proben	141

<b>A.8</b>	<b>Anhang 8: Für die zukünftige, routinemäßige Aminanalyse vorgeschlagene UPLC-MS/MS-Verfahrensbeschreibung</b>	<b>143</b>
<b>1</b>	<b>Vorbereitung</b>	<b>143</b>
1.1	Lösungsmittelmischungen und verdünnte Säuren	143
1.1.1	Laufmittel A und B	143
1.1.2	Mischung A und C	143
1.1.3	Mischung N	144
1.2	Ansetzen der Stammlösungen	144
1.3	Verdünnungsreihen für die Kalibrierung	146
1.4	Stabilität der Lösungen	151
<b>2</b>	<b>Durchführung</b>	<b>152</b>
2.1	Allgemeine Vorgehensweise	152
2.2	Durchführung der Probenahme	152
2.3	Filtrierung der Proben	153
2.4	Probenvorbereitung für den Vortest (V)	153
2.5	Standardadditionsverfahren (A) nach DIN 32633	154
2.6	Injektionsvolumen	155
2.7	Analysensequenz	155
2.7.1	Grobe Kalibrierung	155
2.7.2	Feine Kalibrierung	155
2.7.3	Qualitätssicherung	155
2.7.4	Blindwerte	156
2.7.5	Vortest-Sequenz	156
2.7.6	Sequenz für das Standardadditionsverfahren	156
2.8	Berechnung der Konzentrationen in den Proben	157

# 1 Zusammenfassung und Fazit

## **Ausgangssituation**

PUR-Injektionsharze und Epoxidharze können kanzerogene Amine emittieren. Das DIBt hat daher eine Liste von 19 kanzerogenen Aminen zusammengestellt, davon sind 18 Amine aromatische Amine (im Folgenden DIBt-Amine genannt).

Die Freisetzung der aromatischen Amine aus PUR-Injektionsharzen wird mittels inversen Säulenversuchen (ISV) und anschließender Bestimmung der Amine in den ISV-Eluaten ermittelt. In zwei vom Antragsteller im Vorfeld durchgeführten Forschungsvorhaben wurde ein Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie-Analysenverfahren gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) entwickelt, welches geeignet ist, aromatische Amine in Eluaten aus inversen Säulenversuchen nachzuweisen (Projektphase I: P 52-5-20.85-1453/14). Im Rahmen des zweiten Forschungsvorhabens wurde eine Verfahrensbeschreibung erarbeitet, die als Grundlage für die in diesem Forschungsvorhaben durchgeführten Arbeiten diente (Projektphase II: P 52-5-20.85.1-2009/17).

Da bei inversen Säulenversuchen mit PUR-Injektionsharzen mit anschließender Festphasenextraktion mit einem Kationentauscher zugleich auch die störende Matrix angereichert wird und bei der Festphasenextraktion mit einer Umkehrphase ein großer Teil der Amine nicht oder nur ungenügend erfasst werden können, gibt es kein geeignetes Anreicherungsverfahren (Projektphase II). Daher war eine weitere Optimierung der instrumentellen Analytik notwendig.

## **Ziele**

Das in diesem Bericht vorgestellte Forschungsvorhaben (Projektphase III: P 52-5-20.99-2049/19) verfolgte vier Ziele:

1. Bereitstellung und Validierung eines Analysenverfahrens für alle 18 kanzerogene aromatische Amine aus der DIBt-Amin-Liste.
2. Stoffspezifischer Vergleich der UPLC-MS/MS-Analytik (IBP) mit der in der Routine verwendeten GC-MS-Analytik (extern) in Reinstwasser und in ISV-Injektionsharz-Eluaten.
3. Produktscreening, um die Relevanz der Amine einschätzen zu können.
4. Vergleich des Zeitverlaufs der Aminfreisetzung mit dem TOC-Verlauf.

## **Methodik**

In der dritten Projektphase wurde die UPLC-MS/MS-Analytik auf die 18 aromatischen Amine aus der DIBt-Liste zuzüglich mehrerer Isomere erweitert. Die Methodenentwicklung erfolgte zu Beginn des Forschungsvorhabens, eine abschließende Methodvalidierung wurde zum Ende des Vorhabens durchgeführt.

Für den Methodenvergleich wurden am IBP 12 Proben (wovon jeweils 2 Proben identisch sind) für die – extern an ein Routinelabor vergebene – GC-MS-Analytik

und 12 Proben für die IBP-interne UPLC-MS/MS-Analytik hergestellt. Zunächst wurden vier verschiedene Amin-Mischungen mit unterschiedlichen Amin-Konzentrationen angesetzt. Alle vier Mischungen wurden zu Reinstwasser zugegeben (4 x 2 = 8 Reinstwasserproben). Eine Mischung mit hohen Konzentrationen wurde zu zwei verschiedenen Injektionsharz-ISV-Eluaten (Harz A und Harz B) zugegeben (2 x 2 = 4 Harz-Eluat-Proben). Die GC-MS-Proben wurden im externen Labor 4 Kalendertage nach der Herstellung aufgearbeitet und mittels GC-MS analysiert. Die IBP-intern mittels UPLC-MS/MS analysierten Proben wurden 6 Tage nach der Probenherstellung mit einer isokratischen und einer Gradientenmethode analysiert.

Für das Produktscreening und die Untersuchung des Zeitverlaufs der Aminfreisetzung im inversen Säulenversuch (ISV) wurden die benötigten ISV-Eluat-Fraktionen von einem Labor zur Verfügung gestellt, das routinemäßig inverse Säulenversuche im Rahmen der bauaufsichtlichen Zulassung (abZ) durchführt. Ein Teil der Fraktionsproben wurden ohne Zusatz verschickt und gelagert, anderen Fraktionsproben wurde Ameisensäure zugesetzt (0,023 Vol.-% in der Probe).

### **UPLC-MS/MS-Analytik der DIBt-Amine**

Während des Forschungsvorhabens wurden zwei chromatographische Methoden – eine isokratische und eine Gradienten-Methode – verwendet und miteinander verglichen. Die Gradientenmethode wurde für die 18 DIBt-Amine und die Isomerentrennung optimiert. Die Gradientenmethode dauert (inkl. Injektionszeit) 17,4 min. Die isokratische Methode ist um eine Minute kürzer, eine chromatographische Trennung der 3-/4-Chlor-2-methylisomere ist bei dieser Methode nicht gegeben.

Die Lösungen in den Analysenvials enthalten – auch bei den zu untersuchenden wässrigen Proben durch Zugabe einer Lösung mit höherem Acetonitrilanteil – eine Mischung aus Wasser, Acetonitril und Ameisensäure (0,02 Vol.-%). Verwendet wurde entweder ein Acetonitrilanteil von 35 % oder ein Acetonitrilanteil von 7 % (in den Vials). Beide Mischungen haben Vor- und Nachteile. Mit dem höheren Acetonitrilanteil werden Adsorptionseffekte (z. B. bei p-Kresidin und 4,4'-Thiodianilin) reduziert, andererseits findet (bei Verwendung von nicht entgastem Acetonitril) ein schnellerer Abbau der instabilen Amine statt (z. B. bei 2,4-Diaminoanisol).

Die 18 DIBt-Amine können bezüglich der Analytik in zwei Gruppen eingeteilt werden.

- 15 der 18 DIBt-Amine sind stabil:  
o-Toluidin (A01) / 2,4-TDA (A04) / 4-Chloranilin (A06) / 2,4,5-Trimethylanilin (A07) / p-Kresidin (A08) / 4-Chlor-2-methylanilin (A11) / 2-Naphthylamin (A13) / 4-Aminobiphenyl (A14) / 4,4'-MDA (A16) / 4,4'-Oxydianilin (A17) / 4,4'-Thiodianilin (A19) / o-Aminoazotoluol (A20) / 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) / 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) / 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)

- 3 der 18 DIBt-Amine sind instabil:  
2,4-Diaminoanisol (A09) / Benzidin (A15) / 3,3'-Dimethylbenzidin (A18)

Die 15 stabilen DIBt-Amine weisen sehr niedrige Bestimmungsgrenzen im Bereich zwischen 0,004 µg/L (2-Naphthylamin) und 0,024 µg/L (2,4-TDA) auf. Bei routinemäßiger Verdünnung der Proben um Faktor 2 entspricht dies in den Proben Bestimmungsgrenzen zwischen 0,008 und 0,048 µg/L. Die Ultrahochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie ist zur Analyse der 15 stabilen DIBt-Amine sehr gut geeignet.

Benzidin und 3,3'-Dimethylbenzidin können in Proben ab einer Konzentration von 4 µg/L zuverlässig mittels UPLC-MS/MS analysiert werden (lineare Regression), die Bestimmungsgrenzen in den Proben liegen bei ca. 2 µg/L. Zwischen 0,4 und 4 µg/L ist die UPLC-MS/MS-Analytik bei diesen beiden Aminen aufgrund des Abbaus der Amine während der Analysensequenz unzuverlässig, in diesem Konzentrationsbereich ist für die Kalibrierung eine quadratische Regression in Kombination mit äquidistanten Konzentrationen zu verwenden. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Probenanalyse zeitnah zur Kalibrierung erfolgt. Um geringere Konzentrationen als 0,4 µg/L nachweisen zu können, sind weitere Maßnahmen (z. B. Ausblasen des Sauerstoffs aus den Lösungsmitteln, Zugabe von Antioxidantien) notwendig.

Der Abbau von 2,4-Diaminoanisol kann während einer Analysensequenz sehr schnell (< 1h) und vollständig erfolgen. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Analysentagen waren groß. Auch bei hohen Konzentrationen (bis 10 µg/L) war keine zuverlässige, reproduzierbare Analytik möglich.

Bei der Planung einer Analysensequenz ist zu beachten, dass nach dem Start der Ionisierung das Messsignal bei manchen (stabilen) Aminen abfällt (4-Chloranilin), bei manchen ansteigt (4,4'-MDA und 4,4'-Oxydianilin) und bei wiederum anderen konstant bleibt (4-Chlor-2-methylanilin). Diese gerätetechnische Stabilisierungsphase dauert etwa 12 h und ist eine häufige Ursache für substanzspezifische Abweichungen zwischen der Kalibration vor den Proben und der im Anschluss an die Proben. (Dieser Effekt darf nicht mit einem Abbau des/der Analyten oder dem Abdampfen des Lösungsmittels verwechselt werden.) Das Standardadditionsverfahren hat neben der größeren Robustheit bei matrixbelasteten Proben außerdem den Vorteil, dass die analytische Unsicherheit durch die Veränderung der Detektionsempfindlichkeit des Analysengerätes reduziert ist.

### **Methodenvergleich (UPLC-MS/MS vs. GC-MS) in Reinstwasser**

Die mit der UPLC-MS/MS-Analytik in den Reinstwasserproben ermittelten Konzentrationen stimmen bei den 15 stabilen Aminen sehr gut mit den erwarteten berechneten Konzentrationen überein, sowohl bei den hohen als auch bei den niedrigen Konzentrationen. Nur bei 2,4-TDA, p-Kresidin und 4,4'-Thiodianilin treten geringe bis deutliche Über- und Minderbefunde auf. Die Wiederholbarkeit (Zweifachinjektion aus zwei Vials mit gleicher Probe) ist gut.

Die GC-Analyse ergibt bei der niedrigsten Konzentration (0,1 bis 0,3 µg/L) nur bei 4-Chlor-2-methylanilin eine mit dem erwarteten berechneten Wert übereinstimmende Konzentration. 2-Naphthylamin wird nur in einer der beiden Proben gefunden, die anderen Amine werden nicht nachgewiesen.

Bei der zweitniedrigsten Konzentration (0,4 bis 1,2 µg/L) werden mittels GC-MS-Analytik 9 stabile Amine in beiden Proben nachgewiesen, bei 5 Aminen mit geringen Minderbefunden, bei 2 Aminen mit deutlicheren Minderbefunden. 5 stabile Amine werden in keiner der beiden Proben nachgewiesen, 4,4'-Thiodianilin nur in einer der beiden.

Bei der zweithöchsten Konzentration (0,9 bis 2,6 µg/L) werden mittels GC-MS-Analytik 10 stabile Amine in beiden Proben nachgewiesen, bei 2 Aminen mit geringen Minderbefunden, bei 2 Aminen mit deutlicheren Minderbefunden. 3 stabile Amine werden in keiner der beiden Proben nachgewiesen, 4,4'-MDA und 4,4'-Thiodianilin jeweils nur in einer der beiden.

Bei der höchsten Konzentration (1,3 bis 4,7 µg/L) werden mittels GC-MS-Analytik 11 stabile Amine in beiden Proben nachgewiesen, bei 6 Aminen mit geringen Minderbefunden, bei 2 Aminen mit deutlicheren Minderbefunden, bei 3,3'-Dichlorbenzidin mit einem extremen Überbefund in einer der beiden Proben. 4 stabile Amine – darunter auch 4,4'-MDA – werden in keiner der beiden Proben nachgewiesen.

Mit zunehmender Konzentration werden die Resultate der GC-MS-Analytik besser. Bei niedrigen Konzentrationen ist die UPLC-MS/MS-Analytik deutlich überlegen. Die gut wasserlöslichen Amine (o-Toluidin und 2,4-Diaminotoluol) werden mit der GC-MS-Methode auch in hohen Konzentrationen nicht gefunden. Auch 4,4'-Oxydianilin und 4,4'-MDA werden nicht bzw. nur selten (in 1 von 8 Proben) nachgewiesen. Lediglich beim instabilen 3,3'-Dimethylbenzidin sind die Resultate mittels GC-MS besser als mittels UPLC-MS/MS.

### **Methodenvergleich – Einfluss der Eluatmatrix**

Der Einfluss der Eluatmatrix führt sowohl bei der UPLC-MS/MS-Analytik als auch bei der GC-MS-Analytik gehäuft zu Minderbefunden. In der UPLC-MS/MS-Analytik trat bei 8 von 15 stabilen Aminen ein Minderbefund auf, am ausgeprägtesten bei 2,4,5-Trimethylanilin und bei 4-Chlor-2-methylanilin. In der GC-MS-Analytik wurden nur 9 der 15 stabilen Amine in jeweils beiden Proben nachgewiesen, davon wiesen 5 Amine (gegenüber den Reinstwasserproben) deutliche Minderbefunde in den Eluat-Proben auf. Bei beiden Methoden wurden bei etwa der Hälfte der stabilen Amine in den Eluatproben Minderbefunde erhalten. Die Anwendung eines Standardadditionsverfahrens wird daher empfohlen.

### **Produktscreening und Zeitverlauf im ISV**

Im Laufe des Forschungsvorhabens stand für das Produktscreening und die Untersuchung des Zeitverlaufs nur das ISV-Eluat eines einzigen Injektionsharzprodukts zur Verfügung. In den Eluatfraktionsproben ohne Säure-Zusatz konnten drei DIBt-Amine nachgewiesen werden:

- bis zu 1 µg/L 4-Chloranilin (A06)
- bis zu 15 µg/L 4,4'-MDA (A16) und
- bis zu 4,8 µg/L 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)

Alle drei Amine weisen im Zeitverlauf (1 Fraktion entspricht 0,5 h) mindestens zwei Maxima auf. Die höchste Konzentration jedes der drei Amine wird in Fraktion 7 nachgewiesen. Bei 4,4'-MDA befindet sich ein weiteres, gleich hohes Konzentrationsmaximum in Fraktion 13 und ein niedrigeres Zwischenmaximum in Fraktion 10.

Auch der TOC-Verlauf weist drei Maxima auf, auch hier ist das zweite Maximum niedriger als das erste und das dritte. Das erste TOC-Maximum befindet sich jedoch bereits in Fraktion 4 bis 5, das zweite (niedrigere) in Fraktion 7 und das dritte (höchste) in Fraktion 10. Die TOC-Maxima treten also etwa drei Fraktionen früher auf als die 4,4'-MDA-Maxima.

4-Chloranilin und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA weisen analog zu 4,4'-MDA ein erstes Maximum in Fraktion 7 auf. Das zweite, niedrigere Maximum tritt bei den chlorierten Aminen in Fraktion 11 bis 12 auf.

Die TOC-Maxima werden bisher als Kriterium für die Auswahl der Fraktionen für die Herstellung einer Fraktionsmischung für die GC-MS-Analyse herangezogen. Dem entsprechend wurden die Fraktionen 4, 5, 10 und 11 ausgewählt. In Fraktion 4 sind die Aminkonzentrationen noch sehr gering, sie steigen erst in Fraktion 5 an. Die Fraktionen 6 bis 9, in denen hohen Aminkonzentrationen auftreten, wurden nicht für die GC-MS-Analytik herangezogen. Die Fraktionen 10 und 11 sind bezüglich der Aminkonzentrationen besser gewählt, die zweite Konzentrationsspitze bei 4,4'-MDA in den Fraktionen 12 und 13 wird jedoch nicht erfasst. Beispielhaft zeigt sich anhand des Zeitverlaufs bei diesem Produkt, dass der TOC-Verlauf kein geeignetes Kriterium ist, um Aussagen über den Zeitpunkt (oder die Zeitpunkte) einer maximalen Aminfreisetzung zu tätigen.

In der mittels GC-MS-Analytik untersuchten Fraktionsmischung wurden keine DIBt-Amine nachgewiesen. In der Mischung der vier für die GC-Analytik eingesetzten Fraktionen wird unter Verwendung der UPLC-MS/MS-Ergebnisse eine 4,4'-MDA-Konzentration von ca. 7 µg/L, eine 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA-Konzentration von ca. 1,2 µg/L und eine 4-Chloranilin-Konzentration von ca. 0,2 µg/L erwartet. Beim Methodenvergleich hat sich gezeigt, dass es für die GC-MS-Analytik eine Herausforderung darstellt, 4,4'-MDA und 4-Chloranilin in diesen Konzentrationen nachzuweisen. Bei 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA ist die Lage anders. Beim Methodenvergleich wurden in Reinstwasser 0,8 µg/L und 1,3 µg/L und in Harz B-Eluat 1,3 µg/L ohne Minderbefund und mit guter Wiederholbarkeit nachgewiesen. In Harz A-Eluat wurden statt 1,3 µg/L etwa 0,5 µg/L mit guter Wiederholbarkeit gefunden.

Der Vergleich der angesäuerten Eluat-Fraktionsproben mit den Eluat-Fraktionsproben ohne Zusatz hat ergeben, dass das Ansäuern der Fraktionsproben sowohl im Hinblick auf die Konzentrationen (bei 4,4'-MDA) als auch auf die Anzahl an nachgewiesenen Aminen geringere Befunde liefert. 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA konnte nur in den neutralen Proben nachgewiesen werden (wegen der Zudosierung auch beim Matrixtest der angesäuerten Proben). Das Ansäuern von Eluaten hat sich nicht bewährt. Die Reinstwasserproben beim Methodenvergleich ergaben ohne Zugabe von Säure eine gute Wiederfindung (in der UPLC-MS/MS-Analytik).

### **Fazit**

Von den 18 aromatischen Aminen aus der DIBt-Liste können 15 Amine in Proben mit einer Nachweisgrenze unter 0,015 µg/L und einer Bestimmungsgrenze unter 0,049 µg/L in Eluatproben analysiert werden. Bei zwei Aminen (Benzidin und 3,3'-Dimethylbenzidin) werden in Proben Bestimmungsgrenzen von etwa 2 µg/L erreicht. Ein instabiles Amin (2,4-Diaminoanisol) kann mit dem beschriebenen Analysenverfahren nicht zuverlässig bestimmt werden. Weitere Verfahrensverbesserungen sind möglich, jedoch aufwändig.

Der Methodenvergleich hat aufgezeigt, dass die GC-MS-Analytik bei Konzentrationen unter 1 µg/L sehr häufig und unter 0,5 µg/L nahezu immer falsch negative Ergebnisse liefert. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 0,5 µg/L ist die UPLC-MS/MS-Analytik der GC-MS-Analytik deutlich überlegen.

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der Aminfreisetzung im Vergleich zum TOC-Verlauf hat ergeben, dass TOC-Maxima und Aminmaxima zwar korrelieren, die Aminmaxima jedoch zeitlich (beim untersuchten Produkt um etwa 1,5 h) nach hinten verschoben sein können. Eine Auswahl von Fraktionen für die Aminanalytik anhand des TOC-Gehaltes kann zu Minderbefunden führen.

Das Ansäuern von Eluaten zur Stabilisierung der Amine hat sich nicht bewährt. Zum einen ist der Einfluss der Säure (0,02 bis 0,05 Vol.-%) auf die chemischen Prozesse und die Zusammensetzung im Eluat nicht ausreichend verstanden, zum anderen ist der Aufwand für das Ansäuern der Proben während der Durchführung des Inversen Säulenversuches nicht unerheblich.

Die isokratische Methode hat zwar gegenüber der Gradientenmethode auch Vorteile, der Aufwand einer Analyse mit beiden chromatographischen Methoden steht jedoch in keinem Verhältnis zum Nutzen. Hinzu kommt die Fehleranfälligkeit durch Verwechslungen. Der Methodenvergleich ergab, dass mit der isokratischen Methode in Eluatproben nicht weniger Minderbefunde erhalten werden als mit der Gradientenmethode. Die isokratische Methode kann in Sonderfällen zur Absicherung von Analysenresultaten genutzt werden, bei der Routineanalytik kann darauf verzichtet werden.

Die Minderbefunde in den ISV-Eluaten beim Methodenvergleich haben (für alle drei untersuchten Methoden) die Notwendigkeit für die routinemäßige Anwendung des Standardadditionsverfahrens bestätigt. (Bei diesem Verfahren werden

den Probelösungen mehrere definierte Konzentrationen im interessierenden Konzentrationsbereich zudosiert.) Durch das Standardadditionsverfahren werden zudem die analytischen Unsicherheiten durch die Änderung der Detektionsempfindlichkeit während der gerätetechnischen Stabilisierungsphase verringert.

### **Ausblick**

Im Rahmen des Forschungsvorhabens war geplant, die ISV-Eluate von bis zu 15 Injektionsharzen auf die 18 DIBt-Amine zu untersuchen. Bei bis zu 10 Produkten sollte der Zeitverlauf der Aminfreisetzung im Vergleich zum TOC-Verlauf detailliert untersucht werden. Die große Anzahl an verschiedenen Produkten (und Fraktionen) ist nötig, um einschätzen zu können, welche Amine in den ISV-Eluaten häufig vorkommen und in welchen Fraktionen des inversen Säulenversuchs diese Amine gefunden werden.

Es wird vorgeschlagen, zukünftig routinemäßig ISV-Eluatfraktionen (je Säulenversuch 16 Fraktionen) mittels UPLC-MS/MS-Analytik auf die Freisetzung der 18 DIBt-Amine (ggf. ohne 2,4-Diaminoanisol) zu untersuchen. Dabei kann das Verfahren in einer Variante eingesetzt werden, die gegenüber dem Vorgehen im Forschungsvorhaben deutlich vereinfacht ist:

- Eluat-Probenahme bei 16 Fraktionen  
Fraktionen 3 bis 18 (entspricht einem Gesamtzeitraum von 8 h)
- je Fraktion eine 50 oder 100 mL-Probe
- nur neutrale Proben (also keine Säurezugabe)
- Analyse von 8 Mischfraktionen aus je zwei Fraktionen  
3+4 / 5+6 / 7+8 / 9+10 / 11+12 / 13+14 / 15+16 / 17+18
- nur mit Gradientenmethode
- routinemäßig Vortest und Standardadditionsverfahren\*  
\* 5 äquidistante Konz. von 0,1 bis 0,9 µg/L in Eluatprobe;  $\Delta c = 0,2 \mu\text{g/L}$

Die vorgeschlagene Verfahrensbeschreibung ist in Anhang A.8 zu finden.

## 2 Ausgangssituation und Ziele

### 2.1 Ausgangssituation

Für die Bauwerksabdichtung oder zur Sanierung von Abwasserleitungen werden häufig 2-Komponenten-Polyurethan-Systeme (PUR-Injektionsharze) oder Epoxidharze eingesetzt. Bauwerksabdichtungen und Abwasserleitungen stehen häufig in direktem Kontakt mit Boden und Grundwasser. Daher stellt sich die Frage nach ihrer ökologischen Wirksamkeit, d. h. ob diese Produkte bei Applikation oder während ihrer Lebenszeit einen negativen Einfluss auf Boden und Grundwasser ausüben.

PUR-Injektionsharze und Epoxidharze können kanzerogene Amine emittieren. Das DIBt hat daher eine Liste von 19 kanzerogenen Aminen (Stand: Februar 2019) zusammengestellt, darunter 18 aromatische Amine (im Folgenden DIBt-Amine genannt; s. Tabelle 1) und ein aliphatisches, hydrolyseempfindliches Amin (DIBt-Amin Nr. 17; Ethylenimin [151-56-4]).

Die Freisetzung der aromatischen Amine aus PUR-Injektionsharzen wird mittels inversen Säulenversuchen (ISV) [1-3] und anschließender Bestimmung der Amine in den ISV-Eluaten ermittelt. Eine gängige Methode zur Bestimmung von Aminen ist die Extraktion aus der basischen wässrigen Phase mit einem organischen Lösungsmittel, ggf. Derivatisierung und anschließender Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie als selektive Detektionsmethode (GC-MS). Die Anwendung der Gaschromatographie als Trennmethode für die Bestimmung von Aminen wird zunehmend durch flüssigchromatographische Methoden (LC bzw. HPLC oder UPLC) erweitert [4, 5] bzw. verdrängt [6, 7]. Für die Entscheidung über eine Produktzulassung durch das DIBt wurden bisher Analyseergebnisse eingesetzt, welche mit der GC-MS-Methode ermittelt wurden.

In zwei, vom Antragsteller im Vorfeld durchgeführten Forschungsvorhaben [8, 9] (Auftraggeber: DIBt; Projektphase I und II), wurde ein Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie-Analysenverfahren gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) entwickelt, welches geeignet ist, aromatische Amine in Eluaten aus inversen Säulenversuchen nachzuweisen. Im Rahmen des zweiten Forschungsvorhabens [9] wurde eine Verfahrensbeschreibung erarbeitet, die als Grundlage für die in diesem Forschungsvorhaben durchgeführten Arbeiten dient (Anhang A.7).

Wesentliche Vorteile der UPLC-Methode gegenüber der GC-Methode sind der geringere Arbeitsaufwand (kaum Laborarbeit, fast nur Chromatographiedauer) sowie die geringere benötigte Probenmenge (ca. 10 mL). Ein potenzieller Nachteil im Vergleich zur GC-Methode ist ggf. eine höhere Empfindlichkeit der UPLC-Methode gegenüber Matrixeffekten, weshalb routinemäßig Standardbedingungenuntersuchungen notwendig sind.

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 kein geeignetes Anreicherungsverfahren [9]. Daher war eine weitere Optimierung der instrumentellen Analytik notwendig.

Insgesamt ist die Schaffung einer Datengrundlage und 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.

## 2.2 Ziele des Forschungsvorhabens

Das beantragte Forschungsvorhaben verfolgte vier Ziele:

1. Bereitstellung und Validierung eines Analysenverfahrens für alle 18 kanzerogene aromatische Amine aus der DIBt-Amin-Liste.
2. Stoffspezifischer Vergleich der neu entwickelten UPLC-MS/MS-Methode mit der etablierten GC-MS-Methode anhand von Reinstwasserproben und Harz-Eluat-Proben mit zugesetzten Aminen, insbesondere um falsch positive und falsch negative Analyseergebnisse zu erkennen und um die konkreten Vor- und Nachteile der Verfahren gegenüberstellen und beurteilen zu können.
3. Zusammenstellung von Daten zur Freisetzung der DIBt-Amine aus Bauwerksabdichtungen, um die Relevanz der 18 aromatischen DIBt-Amine für die Bewertung im Rahmen der allgemeinen bauaufsichtlichen Zulassung (abZ) einschätzen zu können.
4. Vergleich der Lage der Maxima der Aminfreisetzung im inversen Säulenversuch (ISV) mit dem TOC-Maximum (total organic carbon) bzw. den TOC-Maxima, um den relevanten Zeitraum zur Bestimmung der Aminfreisetzung auswählen zu können.

### 3 Methodik

#### 3.1 Untersuchungsumfang Amine

In Tabelle 1 sind die für das Forschungsvorhaben eingesetzten 18 DIBt-Amine sowie 5 Isomere zusammengefasst. Die Zuordnung der Benennungen sowie der Nummerierung A01 bis A23 der Amine kann Tabelle 1 entnommen werden, die Strukturformeln sind in Bild 1 (bis A13) und Bild 2 (ab A14) gezeigt.

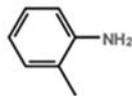
Tabelle 1:

Eingesetzte Amine (inkl. CAS-Nummern) und deren Nummerierung und Benennung im Bericht (IBP) sowie beim DIBt.

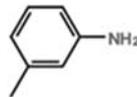
IBP-Nr.	Benennung IBP	CAS-Nr.	DIBt-Nr.	Benennung DIBt
A01	o-Toluidin	95-53-4	13	o-Toluidin
A02	m-Toluidin	108-44-1	(13b)	--
A03	p-Toluidin	106-49-0	(13c)	--
A04	2,4-TDA	95-80-7	18	Tolylen-2,4-diamin
A05	2,6-TDA	823-40-5	(18b)	--
A06	4-Chloranilin	106-47-8	1	4-Chloranilin
A07	2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7	6	2,4,5-Trimethylanilin
A08	p-Kresidin	120-71-8	5	6-Methoxy-m-toluidin
A09	2,4-Diaminoanisol	615-05-4	8	4-Methoxy-m-phenylendiamin
A10	3-Chlor-2-methylanilin	87-60-5	(14b)	--
A11	4-Chlor-2-methylanilin	95-69-2	14	4-Chlor-o-toluidin
A12	1-Naphthylamin	134-32-7	(10b)	--
A13	2-Naphthylamin	91-59-8	10	2-Naphthylamin
A14	4-Aminobiphenyl	92-67-1	11	4-Aminobiphenyl
A15	Benzidin	92-87-5	12	Benzidin
A16	4,4'-MDA	101-77-9	16	4,4'-Diamino-diphenylmethan
A17	4,4'-Oxydianilin	101-80-4	4	4,4'-Oxydianilin
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	119-93-7	19	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminobiphenyl
A19	4,4'-Thiodianilin	139-65-1	7	4,4'-Thiodianilin
A20	o-Aminoazotoluol	97-56-3	15	4-Amino-2',3-dimethylazobenzol
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	838-88-0	9	3,3'-Dimethyl-4,4'-diamino-diphenylmethan
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1	2	3,3'-Dichlorbenzidin
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	101-14-4	3	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)

( ) = Isomer zum DIBt-Amin Nr. 13 bzw. 18 bzw. 14 bzw. 10

**A01** o-Toluidin



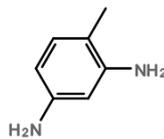
**A02** m-Toluidin



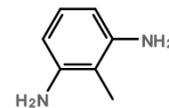
**A03** p-Toluidin



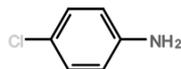
**A04** 2,4-Diaminotoluol  
= 2,4-TDA



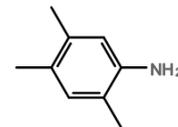
**A05** 2,6-Diaminotoluol  
= 2,6-TDA



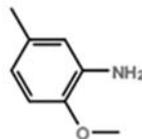
**A06** 4-Chloranilin



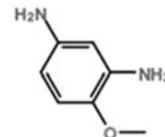
**A07** 2,4,5-Trimethylanilin



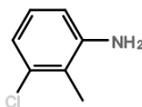
**A08** 6-Methoxy-m-toluidin  
= p-Kresidin



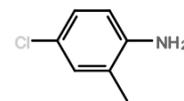
**A09** 4-Methoxy-m-phenylendiamin  
= 2,4-Diaminoanisol



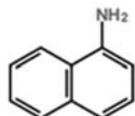
**A10** 3-Chlor-2-methylanilin



**A11** 4-Chlor-2-methylanilin



**A12** 1-Naphthylamin



**A13** 2-Naphthylamin

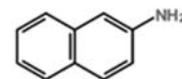
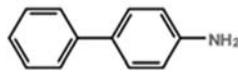
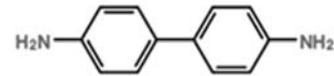


Bild 1:  
Strukturformeln der Amine Nr. A01 bis A13.

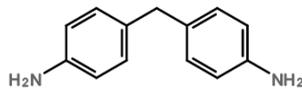
**A14** 4-Aminobiphenyl



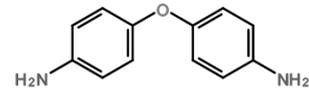
**A15** Benzidin



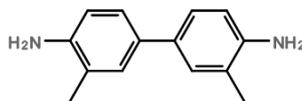
**A16** Diphenylmethan-4,4'-diamin  
= 4,4'-MDA



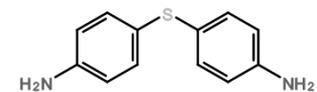
**A17** 4,4'-Oxydianilin



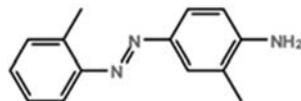
**A18** Tolidin  
= 3,3'-Dimethylbenzidin



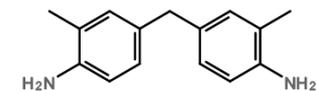
**A19** 4,4'-Thiodianilin



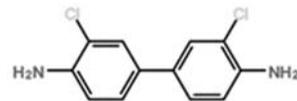
**A20** 4-Amino-2',3-dimethylazo-  
benzol = o-Aminoazotoluol



**A21** 3,3'-Dimethyl-4,4'-diamino-  
diphenylmethan  
= 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA



**A22** 3,3'-Dichlorbenzidin



**A23** 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)  
= 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA

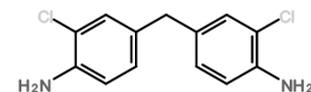


Bild 2:  
Strukturformeln der Amine Nr. A14 bis A23.

Aktuelle Angaben (Stand Februar 2021) zur CMR-Einstufung (C = kanzerogen, M = mutagen, R = reproduktionstoxisch) sind in Tabelle 2 zu finden. Quelle: KMR-Liste (Februar 2021) des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung [10].

Tabelle 2:

CMR-Einstufung (C = cancerogen, M = mutagen, R = reproduktionstoxisch) für die 23 verwendeten aromatischen Amine.

<b>IBP-Nr.</b>	<b>Benennung IBP</b>	<b>CAS-Nr.</b>	<b>C</b>	<b>M</b>	<b>R</b>
A01	o-Toluidin	95-53-4	1B	--	--
A02	m-Toluidin #	108-44-1	--	--	--
A03	p-Toluidin #	106-49-0	2	--	--
A04	2,4-TDA	95-80-7	1B	2	2 (R <sub>F</sub> )
A05	2,6-TDA #	823-40-5	--	2	--
A06	4-Chloranilin	106-47-8	1B	--	--
A07	2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7	1B	--	--
A08	p-Kresidin	120-71-8	1B	--	--
A09	2,4-Diaminoanisol	615-05-4	1B	2	--
A10	3-Chlor-2-methylanilin #	87-60-5	--	--	--
A11	4-Chlor-2-methylanilin	95-69-2	1A* / 1B	2	--
A12	1-Naphthylamin #	134-32-7	--	--	--
A13	2-Naphthylamin	91-59-8	1A	--	--
A14	4-Aminobiphenyl	92-67-1	1A	--	--
A15	Benzidin	92-87-5	1A	--	--
A16	4,4'-MDA	101-77-9	1B	2	--
A17	4,4'-Oxydianilin	101-80-4	1B	1B	2 (R <sub>F</sub> )
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	119-93-7	1B	--	--
A19	4,4'-Thiodianilin	139-65-1	1B	--	--
A20	o-Aminoazotoluol	97-56-3	1B	--	--
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	838-88-0	1B	--	--
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1	1B	--	--
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	101-14-4	1B	--	--

# Isomer zu einem DIBt-Amin.

### 3.2 Instrumentelle Analytik

#### Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

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

#### Flüssigchromatographie (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;  
Gradient\* oder isokratisch (34,8 % Acetonitrilanteil)  
Injektionsvolumen: 25 µL

\*Der Gradient ist in Ziffer 4.1.2 in Bild 5 beschrieben.

### 3.3 Methodvalidierung

#### Stammlösungen

Zu Beginn des Forschungsvorhabens (Januar bis Februar 2020) wurden mehrere Stammlösungen hergestellt und für die Methodenentwicklung eingesetzt. Ab März 2020 wurden 4 weitere Stammlösungen angesetzt (siehe Tabelle 3).

Für das Produktscreening (Ziffer 4.3) wurden die Stammlösungen Dez20 (und Mrz20) eingesetzt (Tabelle 3). Die Stammlösungen Feb21 (Tabelle 3) fanden für den Methodenvergleich Anwendung. Für die abschließende Methodvalidierung, insbesondere für

- die Bestimmung der Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG), der Linearität sowie der Detektionsempfindlichkeit (Geradensteigungen) (Ziffer 4.1.3),
- den QC-Verlauf (Ziffer 4.1.4) und
- die Überprüfung der Haltbarkeit der Stammlösungen (Ziffer 4.1.6)

wurden die Stammlösungen Jun21 (Tabelle 3) verwendet. Die Ergebnisse für die instabilen Amine A09, A15 und A18 sind in Ziffer 4.1.5 zusammengefasst.

Tabelle 3:

Angesetzte Stammlösungen (S 1 bis S 6) im Laufe des Projektes ab März 2020.  
Einwaage i.d.R. zwischen 10 und 15 mg in 50 mL (min. 9 mg und max. 27 mg).

IBP-Nr.	Benennung IBP	Mrz20	Dez20	Feb21	Jun21
A01	o-Toluidin	S 2	S 2	S 2	S 4
A02	m-Toluidin	S 6	S 6	S 3	--
A03	p-Toluidin	S 4	S 4	S 1	--
A04	2,4-TDA	S 4	S 4	S 5	S 4
A05	2,6-TDA	S 6	S 6	S 6	--
A06	4-Chloranilin	S 4	S 4	S 2	S 2
A07	2,4,5-Trimethylanilin	S 2	S 2	S 2	S 2
A08	p-Kresidin	S 2	S 2	S 2	S 2
A09	2,4-Diaminoanisol	S 5	S 5	S 5	S 5
A10	3-Chlor-2-methylanilin	S 6	S 6	S 6	--
A11	4-Chlor-2-methylanilin	S 2	S 2	S 2	S 2
A12	1-Naphthylamin	S 6	S 6	S 6	--
A13	2-Naphthylamin	S 4	S 4 *	S 5	S 4
A14	4-Aminobiphenyl	S 1	S 1	S 1	S 1
A15	Benzidin	S 5	S 5	S 5	S 5
A16	4,4'-MDA	S 3	S 3	S 3	S 3
A17	4,4'-Oxydianilin	S 3	S 3	S 3	S 3
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	S 5	S 5	S 5	S 5
A19	4,4'-Thiodianilin	S 1	S 1	S 1 *	S 1
A20	o-Aminoazotoluol	S 1	S 1	S 1	S 1
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	S 3	S 3	S 3	S 3
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	S 1	--	S 1	S 1
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	S 3	S 3	S 3	S 3

\* sehr geringe Einwaage (jeweils 2,3 mg)

Anmerkung:

Die in den Bildern angegebenen nominalen Konzentrationen – z. B. 0,2 µg/L oder 1,0 µg/L – entsprechen einer Einwaage von 10 mg in 50 mL. Bei Abweichenden Einwaagen verändern sich die Konzentrationen entsprechend.

### 3.4 Injektionsharz-Eluate aus inversen Säulenversuchen (ISV)

Inverse Säulenversuche (ISV) werden eingesetzt zur Bestimmung der dynamischen Auswaschung von Stoffen (z. B. Schwermetalle, Acrylsäure oder Amine) aus Festkörpern (z. B. Polyacrylat-Dichtmassen oder Polyurethan-Injektionsharze) in ein flüssiges Elutionsmittel (z. B. Leitungswasser) [1-3] [8-9]. Die Apparatur für den inversen Säulenversuch ist in Bild 3 schematisch dargestellt.

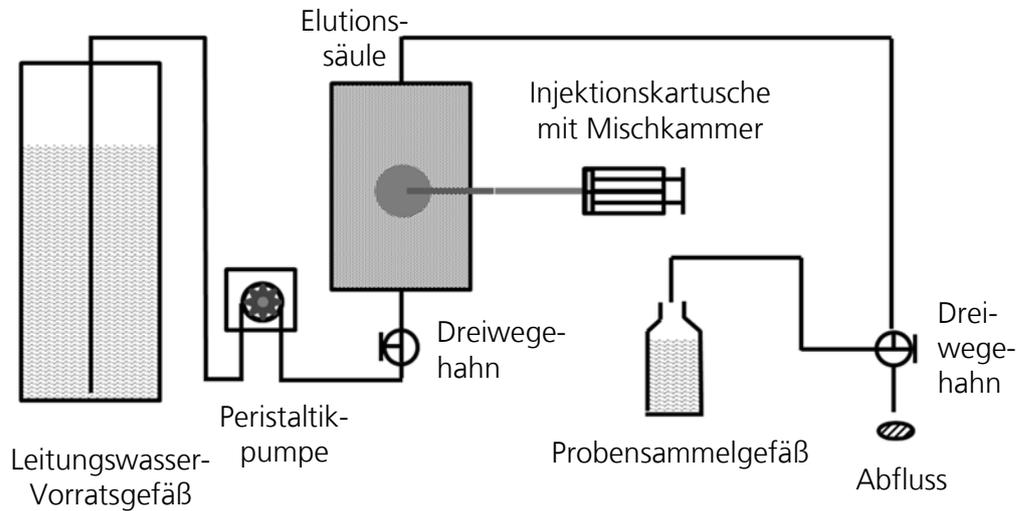


Bild 3:

Inverser Säulenversuch: Umspülung des zuvor injizierten Probekörpers mit Leitungswasser und Auffangen des Eluats. Fluss: 4 L/h; Fraktionsvolumen: 2 L (entspricht 0,5 h).

In diesem Forschungsvorhaben wurde für das Projekt screening und für die Untersuchung des Zeitverlaufs im ISV ein Eluat aus einem inversen Säulenversuch eingesetzt, das von einem Untersuchungslabor zur Verfügung gestellt wurde. Am IBP wurden keine inversen Säulenversuche durchgeführt. Die Eluate bzw. Fraktionsmischungen, die für den Methodenvergleich mit matrixbelastetem Eluat eingesetzt wurden (Harz A und Harz B), stammen aus inversen Säulenversuchen, die in der ersten Projektphase im November 2015 durchgeführt wurden [8]. Eines der für den damaligen inversen Säulenversuch verwendeten Injektionsharze, das 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. Das Harz B war ein kommerziell erhältliches Produkt.

### 3.5 Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS

#### Ansatz der Probenlösungen für den Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich zwischen GC-MS und UPLC-MS/MS wurden 4 verschiedene Aminmischungen angesetzt (mit den Stammlösungen Feb21, Dez20 und Mrz20; letztere nach Prüfung auf Stabilität). Den Proben (A, B, C und D in Bild 4), also den verdünnten Aminmischungen, wurde keine Säure zugesetzt.

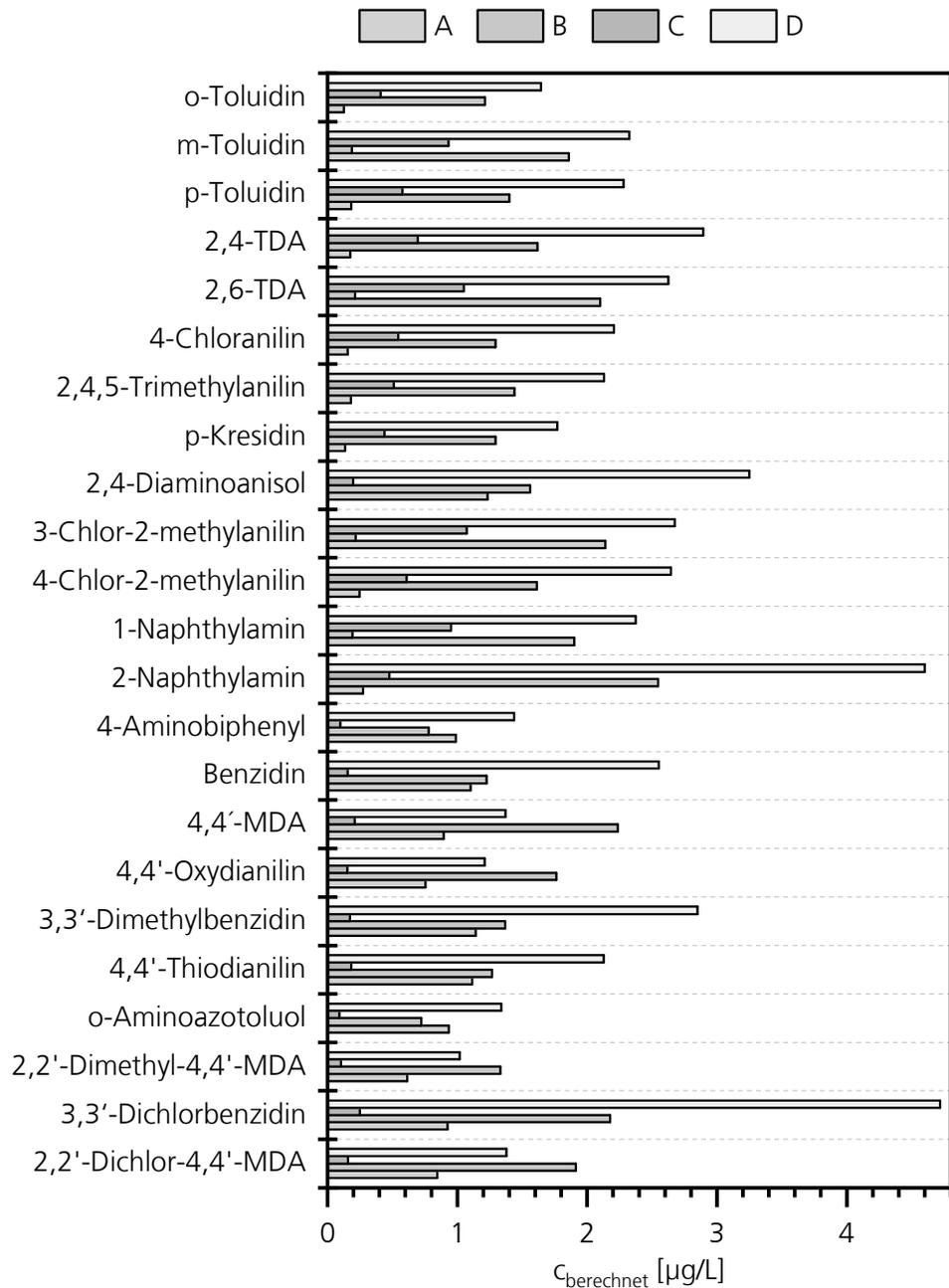


Bild 4:  
Konzentrationen, die nach Zugabe der Mischungen A, B, C oder D in den Proben erhalten werden (0,1 bis 4,7 µg/L).

## Durchführung des Methodenvergleichs

Mit den Aminmischungen A bis D wurden folgende Proben bzw. Lösungen hergestellt:

- a) Alle vier Mischungen wurden zu Reinstwasser zugegeben (alle ohne Säurezusatz). [AP 4.1]
- b) Außerdem wurde Mischung D zu zwei (bereits angesäuerten) Eluaten aus inversen Säulenversuchen (ISV) zudosiert [AP 4.2]:
  - ISV-Eluat von Harz B (geringer Matrixeffekt erwartet)
  - ISV-Eluat von Harz A (ausgeprägter Matrixeffekt erwartet)

Diese sechs Varianten (4 + 2) wurden jeweils zweifach angesetzt.

Insgesamt wurden somit 12 Proben angesetzt, wovon jeweils 2 Proben identisch sind. Die Zuordnung zu den Probennummern ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die GC-MS-Proben wurden extern analysiert, die UPLC-MS/MS-Proben im IBP.

Tabelle 4:  
Angesetzte Proben für den Methodenvergleich.

<b>Probennummer (GC-Analytik)</b>	<b>Flüssigkeit</b>	<b>zudosierte Mischung</b>
E3483-01	Eluat Harz B	D
E3483-02	Reinstwasser	B
E3483-03	Reinstwasser	C
E3483-04	Eluat Harz A	D
E3483-05	Reinstwasser	C
E3483-06	Eluat Harz A	D
E3483-07	Reinstwasser	A
E3483-08	Reinstwasser	D
E3483-09	Reinstwasser	B
E3483-10	Eluat Harz B	D
E3483-11	Reinstwasser	A
E3483-12	Reinstwasser	D

Zwischen Zugabe der Mischungen und der Analyse mittels GC-MS lagen 4 Kalendertage (Do-Mo). Bei der UPLC-MS/MS-Analyse lagen 6 Kalendertage zwischen Zudosierung und Analyse (Do-Mi).

### 3.6 Produktscreening und Zeitverlauf im ISV

#### Bereitstellung der ISV-Eluate

Die Eluatfraktionsproben wurden von einem Labor bereitgestellt, das routinemäßig inverse Säulenversuche im Rahmen der allgemeinen bauaufsichtlichen Zulassung (abZ) durchführt.

Die Fraktionsproben (Tabelle 5) wurden in 4 mL Schraubdeckelgefäße abgefüllt (je 4,3 mL bis zum Flaschenhals). Bei den angesäuerten Fraktionsproben wurden 10 µL einer 1:5 verdünnten Ameisensäure zugegeben, der erhaltene Ameisensäuregehalt in den Fraktionsproben lag somit bei 0,047 Vol.-%. In den 1:2-verdünnten Proben wird bei der UPLC-MS/MS-Analytik eine Säurekonzentration von 0,023 Vol.-% erhalten.

Tabelle 5:  
ISV-Eluat-Fraktionsproben für das Produktscreening und den Zeitverlauf im ISV.

Fraktionsbenennung	Fraktionsnummer	neutrale Proben		angesäuerte Proben		Zeitintervall (bei 4 L/h und 2 L/Fraktion)
		Vor-test	Spurenanalyse & Matrixtest	Vor-test	Spurenanalyse & Matrixtest	
BW	(0)	x		x		--
F1	4	x		x		2,0 bis 2,5 h
F2	5	x		x		2,5 bis 3,0 h
F2	6	x		x	x	3,0 bis 3,5 h
F4	7	x	x	x	x	3,5 bis 4,0 h
F5	8	x	x	x	x	4,0 bis 4,5 h
F6	9	x	x	x	x	4,5 bis 5,0 h
F7	10	x	x	x	x	5,0 bis 5,5 h
F8	11	x	x	x	x	5,5 bis 6,0 h
F9	12	x	x	x	x	6,0 bis 6,5 h
F10	13	x	x	x		6,5 bis 7,0 h
F11	15	x		x		7,5 bis 8,0 h
F12	17	x		x		8,5 bis 9,0 h

#### Durchführung Produktscreening und Zeitverlauf im ISV

Die Proben wurden nach der Verfahrensbeschreibung in Anhang A.7 bearbeitet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Instrumentelle Analytik und Methodvalidierung

#### 4.1.1 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

In Tabelle 6 sind die verwendeten Massenübergänge aufgeführt (5 Isomere analog zum jeweiligen DIBt-Amin).

Tabelle 6:

Bei der Tandemmassenspektrometrie genutzte Massenübergänge für die 18 DIBt-Amine.

IBP-Nr.	Benennung IBP	M+H <sup>+</sup> [u/e]	M <sub>Quantifizierung</sub> [u/e]	M <sub>Qualifizierung</sub> [u/e]
A01	o-Toluidin <sup>§</sup>	108	91	65
A04	2,4-TDA <sup>&amp;</sup>	123 <sup>#</sup>	106 <sup>#</sup>	108 <sup>#</sup>
A06	4-Chloranilin	128	93	111
A07	2,4,5-Trimethylanilin	136	91	77
A08	p-Kresidin	138	123	106
A09	2,4-Diaminoanisol	139 <sup>#</sup>	108 <sup>#</sup>	122 <sup>#</sup>
A11	4-Chlor-2-methylanilin <sup>§</sup>	142	107	125
A13	2-Naphthylamin <sup>*</sup>	144	127	117
A14	4-Aminobiphenyl	170	152	127
A15	Benzidin	185	168	151
A16	4,4'-MDA	199	106	182
A17	4,4'-Oxydianilin	201	80	108
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	213	198	181
A19	4,4'-Thiodianilin	217	124	80
A20	o-Aminoazotoluol	226	107	91
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	227	120	--
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	253	217	182
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	267	140	231

<sup>§</sup> inkl. Isomere A02 und A03

<sup>&</sup> inkl. Isomer A05

<sup>#</sup> Keine chromatographische Trennung von A04 (Methylgruppe) und A09 (Methoxygruppe). Interferenzen sind möglich.

<sup>§</sup> inkl. Isomer A10

<sup>\*</sup> inkl. Isomer A12

#### 4.1.2 Flüssigchromatographie (UPLC)

Der Gradient wurde ab Minute 11 an die neu hinzugekommenen Amine angepasst (Bild 5). Der Acetonitrilanteil musste auf 60 % angehoben werden, damit auch o-Aminoazotoluol (A20) schnell genug durch die UPLC-Säule wandert. Da ein hoher Acetonitrilanteil bei anderen Aminen zu einer Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit führt und damit die gute Trennung der Chlor-2-methylisomere erhalten bleibt, wurde an der Methode aus der vorherigen Teilprojektphase (II) bis Minute 11 nichts geändert. Gegenüber der vorherigen Gradientenmethode ergab sich eine um 1 min längere Methode, sie dauert nun 16 min. Zuzüglich der Dauer für die Injektion und anderer Geräteprozesse dauert ein Lauf effektiv 0,290 h bzw. 17,4 min (exakt 0,28975 h).

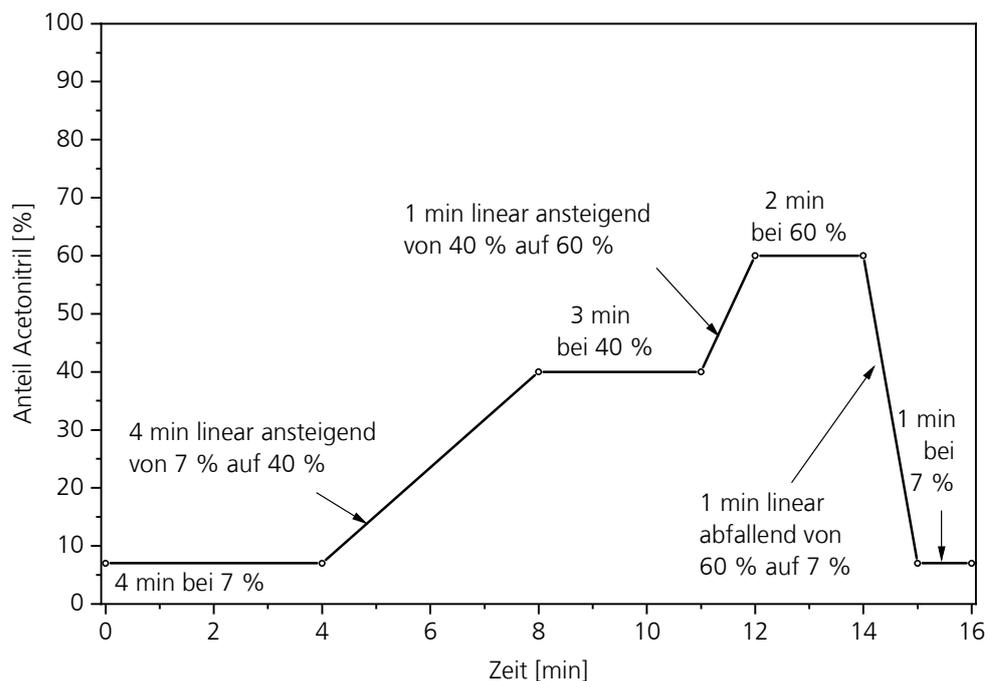


Bild 5:  
Laufmittel-Gradient für die UPLC.

In Tabelle 7 sind die Retentionszeiten bei Verwendung der Gradientenmethode (Bild 5) und der isokratischen Methode (65,2 % Wasser / 34,8 % Acetonitril / 0,02 % Ameisensäure) aufgeführt.

#### Anmerkung:

Bei der isokratischen Methode werden die Chlor-2-methylaniline A10 (3-Chlor) und A11 (4-Chlor) nicht getrennt (Tabelle 7). Da beim Methodenvergleich (Ziffer 4.2) auch 3-Chlor-2-methylanilin als Störkomponente zugegeben wurde (Bild 4), sind für 4-Chlor-2-methylanilin bei der isokratischen Methode (grüne Balken in Bild 35 bis Bild 38) keine Resultate dargestellt. Bei der Prüfung auf Matrixeffekte im Harz-Eluat beim Methodenvergleich (Bild 40) wurden sowohl bei der Kalibrierung als auch bei der Analyse der Proben beide Isomere zusammengefasst.

Tabelle 7:  
Retentionszeiten der 18 DIBt-Amine sowie der 5 Isomere.

IBP-Nr.	Benennung IBP	RT [min] Gradient	RT [min] isokratisch
A01	o-Toluidin	3,15	2,49
A02	m-Toluidin	3,39 *	2,70 *
A03	p-Toluidin	3,30 *	2,80 *
A04	2,4-TDA	2,02 #	2,40
A05	2,6-TDA	1,61 *	2,20 *
A06	4-Chloranilin	5,46	2,60
A07	2,4,5-Trimethylanilin	8,37	4,04
A08	p-Kresidin	5,92	2,98
A09	2,4-Diaminoanisol	2,02 #	-- <sup>§</sup>
A10	3-Chlor-2-methylanilin	8,62 *	3,29 *
A11	4-Chlor-2-methylanilin	8,39	3,29
A12	1-Naphthylamin	8,28 *	3,20 *
A13	2-Naphthylamin	8,47	3,51
A14	4-Aminobiphenyl	10,44	5,25
A15	Benzidin	5,38	4,08
A16	4,4'-MDA	5,83	6,50
A17	4,4'-Oxydianilin	4,70	5,78
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	10,39	4,83
A19	4,4'-Thiodianilin	9,52	4,23
A20	o-Aminoazotoluol	13,03	12,72
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	9,57	7,50
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	11,74	7,10
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	11,79	7,21

\* Isomer zu einem DIBt-Amin.

§ Peakzuordnung aufgrund der Instabilität des Amins nicht eindeutig.

# Keine chromatographische Trennung von A04 (Methylgruppe) und A09 (Methoxygruppe). Interferenzen sind möglich. <sup>§</sup>

### 4.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Am Ende des Forschungsvorhabens wurde für 15 der 18 untersuchten DIBt-Amine und für die Gradientenmethode bei einem Acetonitrilanteil von 35 % (Durchführung nach Anhang A.8) eine abschließende Validierung nach DIN 32645:2008-11 [11] durchgeführt:

- Um die Grenzen des Verfahrens zu erfassen, liegt der niedrigste verwendete Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,09 µg/L (K001 bis K009; Lauf Nr. 106 bis 132). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des DIN-Tests zusammengestellt.
- Der mittlere Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,05 und 0,45 µg/L (K005 bis K045; Lauf Nr. 140 bis 166).  
Bei einer 1:2-Verdünnung entspricht das im Eluat 0,1 bis 0,9 µg/L. In diesem Konzentrationsbereich wird im anvisierten Eluat-Untersuchungsverfahren die Standardaddition erfolgen (0,05 / 0,15 / 0,25 / 0,35 und 0,45 µg/L). In Tabelle 9 sind die Ergebnisse des DIN-Tests zusammengestellt.
- Der obere für die Validierung verwendete Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,2 und 1,8 µg/L (K020 bis K180; Lauf Nr. 211 bis 237). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse des DIN-Tests zusammengestellt.

Bei folgenden drei der 18 DIBt-Amine funktioniert das Analysenverfahren nicht zuverlässig (siehe Ziffer 4.1.5):

- 2,4-Diaminoanisol (A09),
- Benzidin (A15) und
- 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

Die analytischen Eigenschaften der Amine A08, A15 und A18 sind in Ziffer 4.1.5 thematisiert.

Die angegebenen, nominalen Konzentrationen entsprechen einer Einwaage von 10 mg und einer bestimmten Verdünnung. Bei höheren bzw. niedrigeren Einwaagen und ggf. abweichenden Zudosierungsvolumina erhöhen bzw. verringern sich die tatsächlichen Konzentrationen entsprechend.

Im Folgenden sind für die 15 Amine die Flächenintegrale gegen die Konzentrationen aufgetragen. Für jedes Amin ist sowohl der Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L dargestellt (Bild 12 bis Bild 21) als auch bis 2,5 µg/L (im Anhang; Bild 49 bis Bild 63).

Bei Verwendung der niedrigsten Konzentrationen liegen die Nachweisgrenzen bei den 15 validierten Aminen zwischen 0,001 und 0,008 µg/L und die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,004 und 0,024 µg/L (siehe Tabelle 8). Innerhalb einer 10er-Potenz ist bei allen Aminen und allen Konzentrationsbereichen eine lineare Regression vertretbar.

Tabelle 8:  
Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der  
Konz. von 10 bis 90 ng/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).

IBP-Nr.	Stoffname (IBP)	NWG [ng/L]	BG [ng/L]	optimale Regression	lin. Repr. vertretbar
A01	o-Toluidin	3,1	10	linear	ja
A04	2,4-TDA	8,1	24	quadratisch	ja
A06	4-Chloranilin	3,7	12	linear	ja
A07	2,4,5-Trimethylanilin	3,5	11	linear	ja
A08	p-Kresidin	2,5	8	linear	ja
A11	4-Chlor-2-methylanilin	2,7	9	linear	ja
A13	2-Naphthylamin	1,1	4	linear	ja
A14	4-Aminobiphenyl	1,4	5	linear	ja
A16	4,4'-MDA	4,0	13	linear	ja
A17	4,4'-Oxydianilin	4,5	14	linear	ja
A19	4,4'-Thiodianilin	7,0	21	linear	ja
A20	o-Aminoazotoluol	6,3	19	quadratisch	ja
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	2,5	8	linear	ja
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	6,3	19	quadratisch	ja
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	6,1	19	quadratisch	ja

In Tabelle 11 und in Bild 6 sind für die 15 stabilen Amine die Geradensteigungen  $m$  für die drei verschiedenen Konzentrationsbereiche zusammengefasst. Die Detektionsempfindlichkeit bzw. die Steigung nimmt tendenziell zu, je höher die Konzentrationsbereiche für die Kalibrierung liegen. Besonders ausgeprägt ist die Zunahme bei p-Kresidin (A08) (Tabelle 11 und in Bild 6). Bei 2,4-TDA (A04) streuen die Messwerte (Bild 8 und Bild 50), weshalb auch die Steigungen mit einem größeren Fehler behaftet sind (s. auch Bild 26). Bei o-Aminoazotoluol (A20) bleibt die Geradensteigung relativ konstant, allerdings wird im unteren Konzentrationsbereich (0,01 bis 0,09  $\mu\text{g/L}$ ) eine quadratische Regression empfohlen (s. Bild 18). Bei 4-Chlor-2-methylanilin (A11) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) ist nur im unteren Konzentrationsbereich (0,25  $\mu\text{g/L}$  vs. 0,05  $\mu\text{g/L}$ ) eine Zunahme der Steigung zu finden. Bei letzterem (A23) wird ebenfalls im unteren Konzentrationsbereich (0,01 bis 0,09  $\mu\text{g/L}$ ) eine quadratische Regression empfohlen (s. Bild 21).

Tabelle 9:  
Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der  
Konz. von 50 bis 450 ng/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).

IBP-Nr.	Stoffname (IBP)	NWG [ng/L]	BG [ng/L]	optimale Regression	lin. Regr. vertretbar
A01	o-Toluidin	12	40	linear	ja
A04	2,4-TDA	42	124	quadratisch	ja
A06	4-Chloranilin	11	37	linear	ja
A07	2,4,5-Trimethylanilin	6	21	linear	ja
A08	p-Kresidin	13	43	linear	ja
A11	4-Chlor-2-methylanilin <sup>§</sup>	8	29	linear	ja
A13	2-Naphthylamin	10	34	linear	ja
A14	4-Aminobiphenyl	13	43	linear	ja
A16	4,4'-MDA	15	50	linear	ja
A17	4,4'-Oxydianilin	21	66	linear	ja
A19	4,4'-Thiodianilin <sup>#</sup>	14	48	linear	ja
A20	o-Aminoazotoluol	7	25	linear	ja
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	13	42	linear	ja
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	13	41	linear	ja
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	13	42	linear	ja

<sup>§</sup> ein Messpunkt (0,25 µg/L) eliminiert (nach Ausreißertest)

<sup>#</sup> ein Messpunkt (0,25 µg/L) eliminiert (nach Ausreißertest)

Tabelle 10:  
Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der  
Konz. von 0,2 bis 1,8 µg/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).

IBP-Nr.	Stoffname (IBP)	NWG [ng/L]	BG [ng/L]	optimale Regression	lin. Regr. vertretbar
A01	o-Toluidin	28	96	linear	ja
A04	2,4-TDA	114	354	linear	ja
A06	4-Chloranilin	25	86	linear	ja
A07	2,4,5-Trimethylanilin	27	91	linear	ja
A08	p-Kresidin	52	168	linear	ja
A11	4-Chlor-2-methylanilin	36	119	linear	ja
A13	2-Naphthylamin	33	110	linear	ja
A14	4-Aminobiphenyl	20	67	linear	ja
A16	4,4'-MDA	38	126	linear	ja
A17	4,4'-Oxydianilin	49	161	linear	ja
A19	4,4'-Thiodianilin	89	280	linear	ja
A20	o-Aminoazotoluol	22	76	linear	ja
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	19	65	linear	ja
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	26	87	linear	ja
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	25	85	linear	ja

Vier Amine mit geringen Geradensteigungen (Tabelle 11 und Bild 6) sind:

- 4-Chloranilin (A06),
- 4,4'-Oxydianilin (A17),
- 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) und
- 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23).

Da bei diesen vier Aminen sehr selektive Massenübergänge verwendet werden und das Basisrauschen daher sehr gering ist, werden trotz der geringen Geradensteigungen sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht (A06: 0,0037 bzw. 0,012 µg/L; A17: 0,0045 bzw. 0,014 µg/L; A22: 0,0063 bzw. 0,019 µg/L; A23: 0,0061 bzw. 0,019 µg/L; Tabelle 8).

Durch Verwendung einer quadratischen Regression für 3,3'-Dichlorbenzidin (A22), 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) und o-Aminoazotoluol (A20), können die Kalibrierungen dieser drei Amine weiter verbessert werden. Der Grund für das

quadratische Verhalten bei niedrigen Konzentrationen liegt bei diesen drei Aminen in der Neigung zur Verschleppung; diese drei Amine werden in sehr geringer Menge (wenigen Femtogramm entsprechend) auch in Blindwert-Proben gefunden.

Tabelle 11:  
Geradensteigungen der Kalibriergeraden.

<b>IBP-Nr.</b>	<b>Stoffname (IBP)</b>	<b>m<sub>0,01-0,09</sub> [Tsd./pg]</b>	<b>m<sub>0,05-0,45</sub> [Tsd./pg]</b>	<b>m<sub>0,2-1,8</sub> [Tsd./pg]</b>
A01	o-Toluidin	3,67	3,82	3,92
A04	2,4-TDA	3,74	2,99	3,72
A06	4-Chloranilin	3,47	3,78	3,89
A07	2,4,5-Trimethylanilin	9,66	10,45	11,45
A08	p-Kresidin	24,9	26,8	33,0
A11	4-Chlor-2-methylanilin <sup>§</sup>	14,3	14,9	14,9
A13	2-Naphthylamin	24,2	26,9	28,1
A14	4-Aminobiphenyl	17,2	18,8	19,9
A16	4,4'-MDA	15,2	16,7	17,2
A17	4,4'-Oxydianilin	1,10	1,21	1,39
A19	4,4'-Thiodianilin <sup>#</sup>	6,16	6,80	8,06
A20	o-Aminoazotoluol	18,5	18,3	19,0
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	8,37	8,98	9,75
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	2,38	2,61	2,68
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	2,73	2,95	3,00

<sup>§</sup> ein Messpunkt (0,25 µg/L) eliminiert (nach Ausreißertest)

<sup>#</sup> ein Messpunkt (0,25 µg/L) eliminiert (nach Ausreißertest)

Von den 15 stabilen Aminen weisen o-Toluidin (A01) und 2,4-TDA (A04) die ungünstigsten Bedingungen für die Analytik auf. Bei der Validierung wurde zwar auch für o-Toluidin (A01) eine sehr niedrige Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze erreicht (0,0031 bzw. 0,010 µg/L), die Kombination aus geringer Detektionsempfindlichkeit bzw. Geradensteigung (3,7 bis 3,9 Tsd./pg), mittelmäßiger Selektivität des Massenübergangs (-NH<sub>3</sub>) und in der Praxis oft ungenügender chromatographischer Trennung (Retentionszeit: 3,15 min) führt jedoch, insbesondere in ISV-Eluaten, zu schlechteren Ergebnissen als nach den Validierungsdaten theoretisch zu erwarten ist.

2,4-TDA (A04) hat die schlechtesten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aller 15 stabiler Amine (0,0081 bzw. 0,024 µg/L). Neben

- der geringen Detektionsempfindlichkeit bzw. Geradensteigung (3,0 bis 3,7 Tsd./pg),
- größerer Schwankungen des Flächenintegrals (Bild 8 & Bild 26) und
- dem zeitlich instabilen Messsignal (entweder aufgrund eines Abbaus des Analyten oder aufgrund von Effekten der instrumentellen Analytik)

stellt in der Praxis, insbesondere bei der Analyse in ISV-Eluaten, die

- ungenügende chromatographische Trennung (Retentionszeit: 2,02 min) in Kombination mit der
- mittelmäßigen Selektivität des Massenübergangs (-NH<sub>3</sub>)

eine Herausforderung dar.

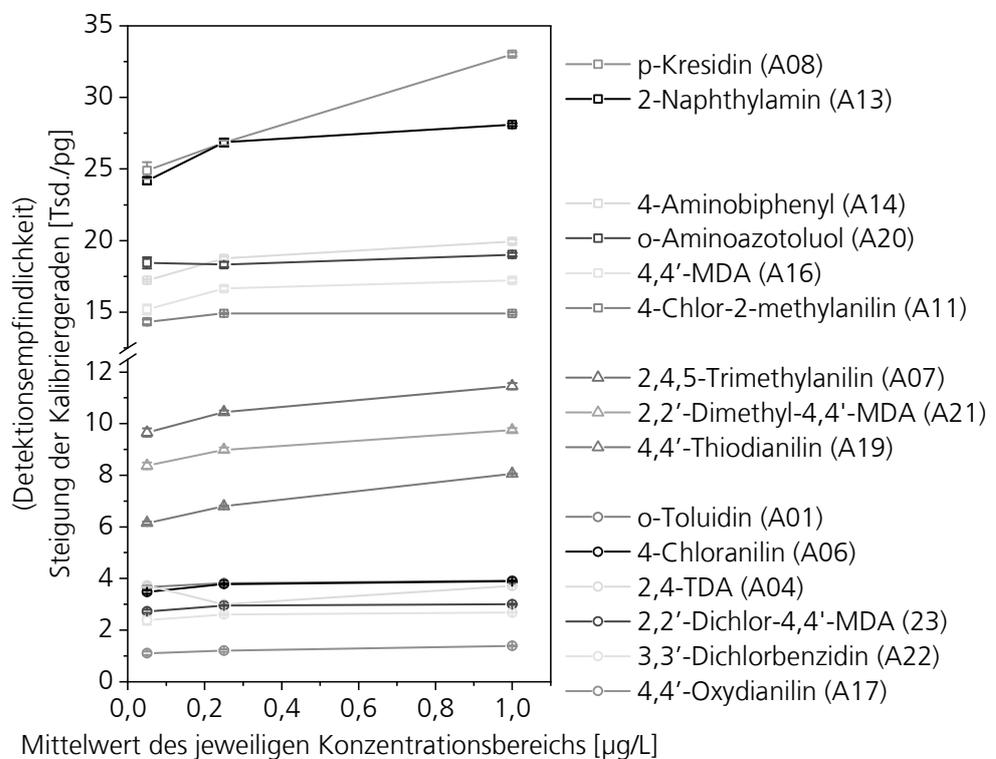


Bild 6:

Vergleich der Steigungen der Kalibriergeraden für die 15 stabilen Amine und die drei (nominalen) Konzentrationsbereiche 0,01 bis 0,09 µg/L (MW: 0,05 µg/L), 0,05 bis 0,45 µg/L (MW: 0,25 µg/L) und 0,2 bis 1,8 µg/L (MW: 1,0 µg/L) [Injektionsvolumen: 25 µL].

In den folgenden Diagrammen sind für die 15 stabilen Amine die Flächenintegrale (area) gegen die Konzentrationen (bis zu einer Konzentration von 0,7 µg/L) aufgetragen. (Die Diagramme bis 2,5 µg/L sind im Anhang A.1 gezeigt.)

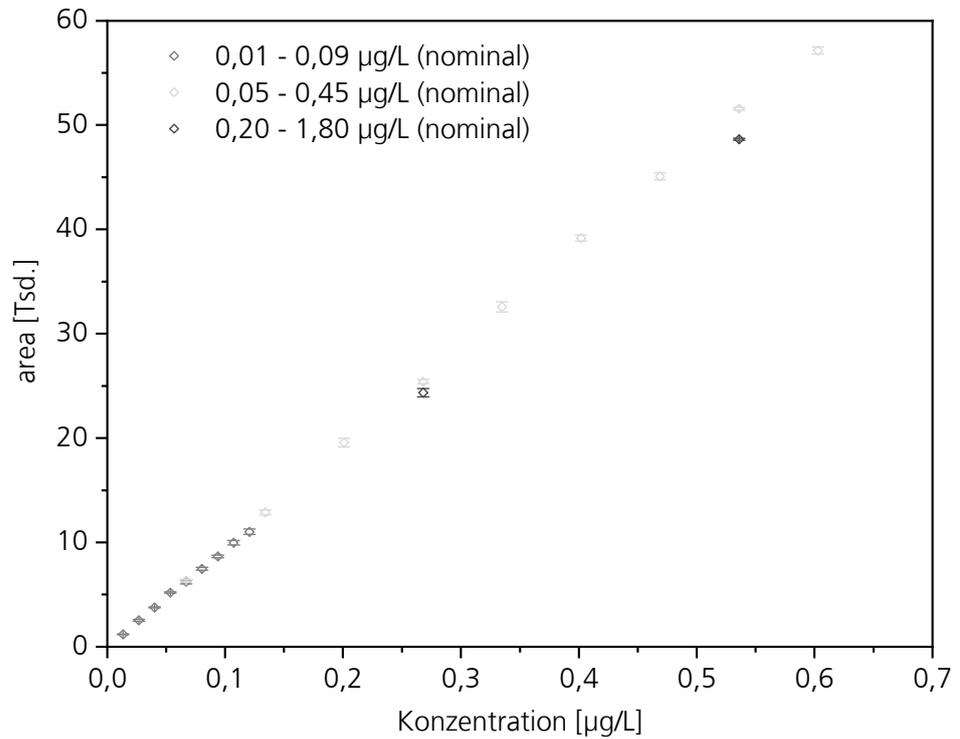


Bild 7:  
Kalibrierung von o-Toluidin (A01) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.

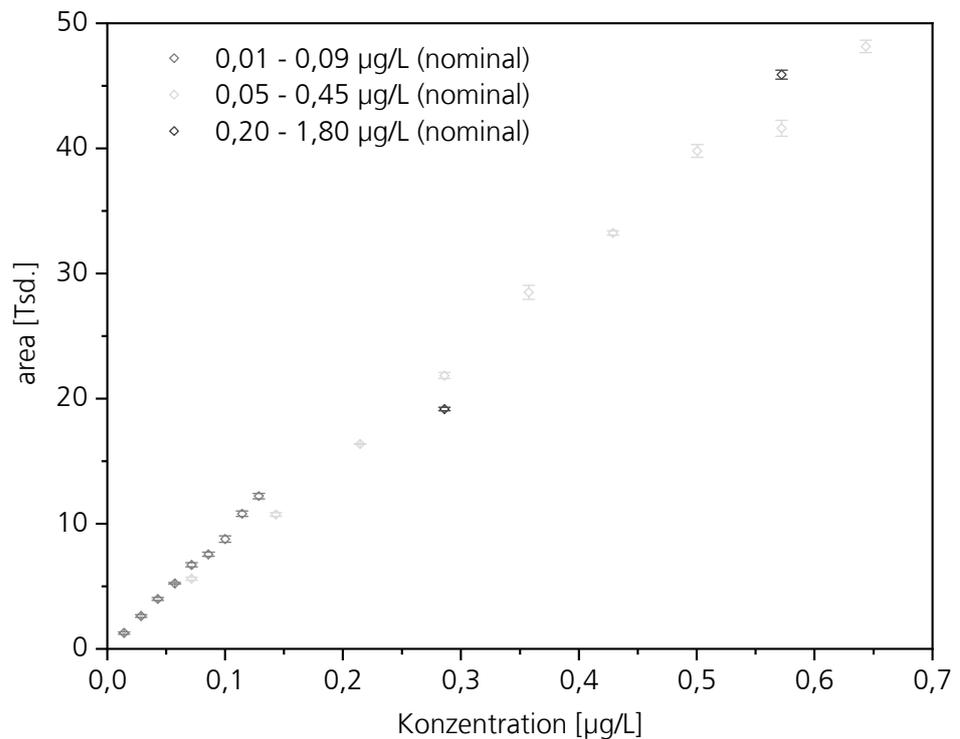


Bild 8:  
Kalibrierung von 2,4-TDA (A04) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.

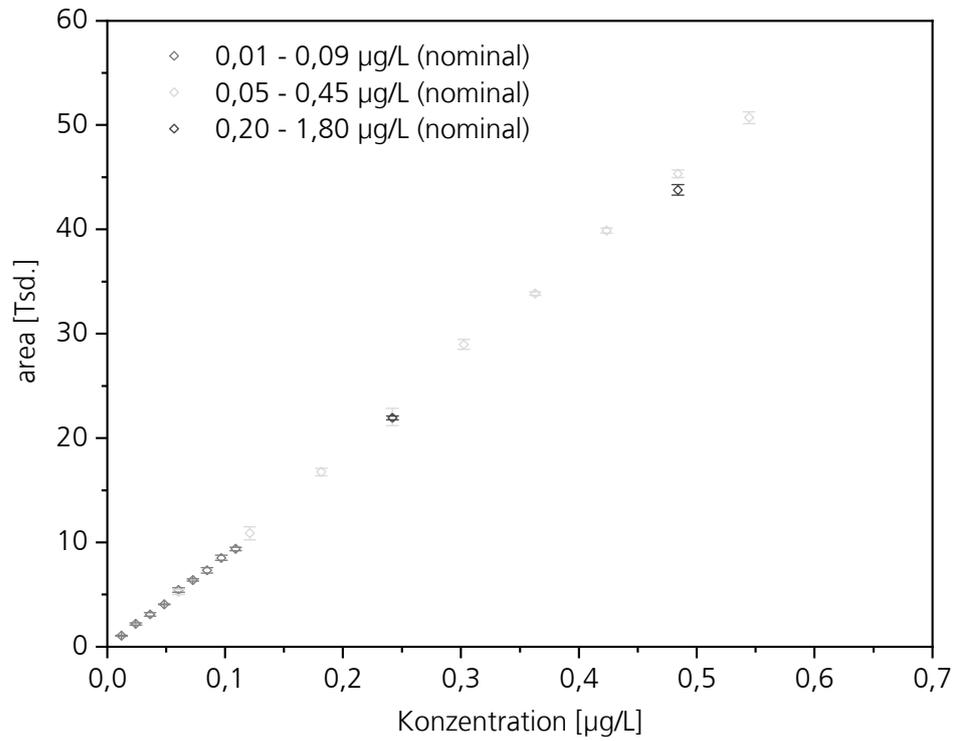


Bild 9:  
Kalibrierung von 4-Chloranilin (A06) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.

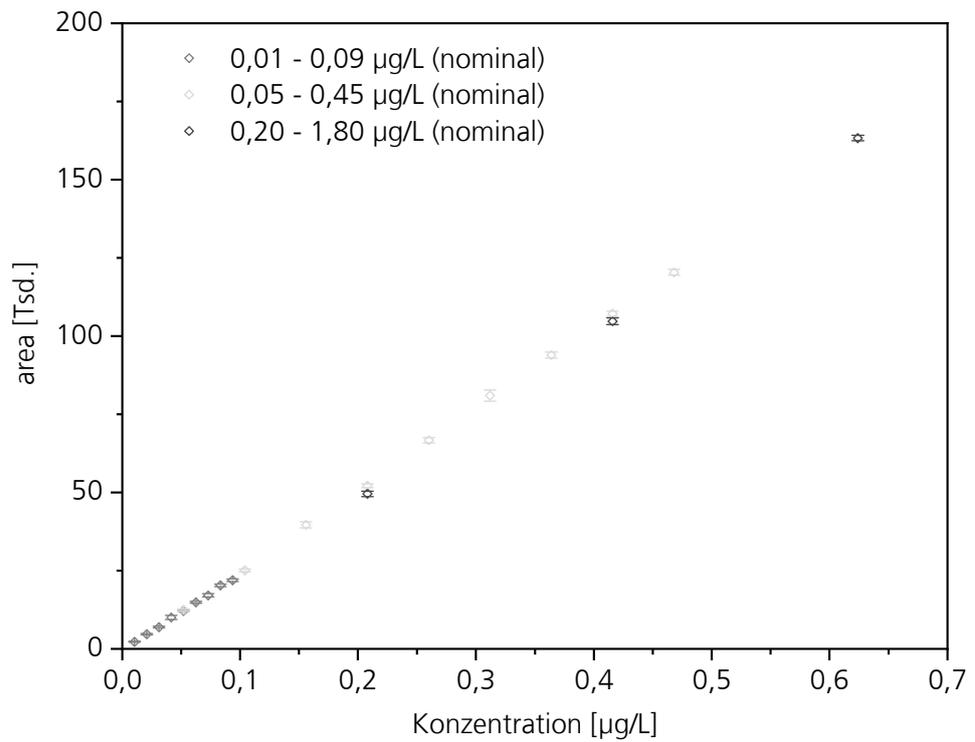


Bild 10:  
Kalibrierung von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

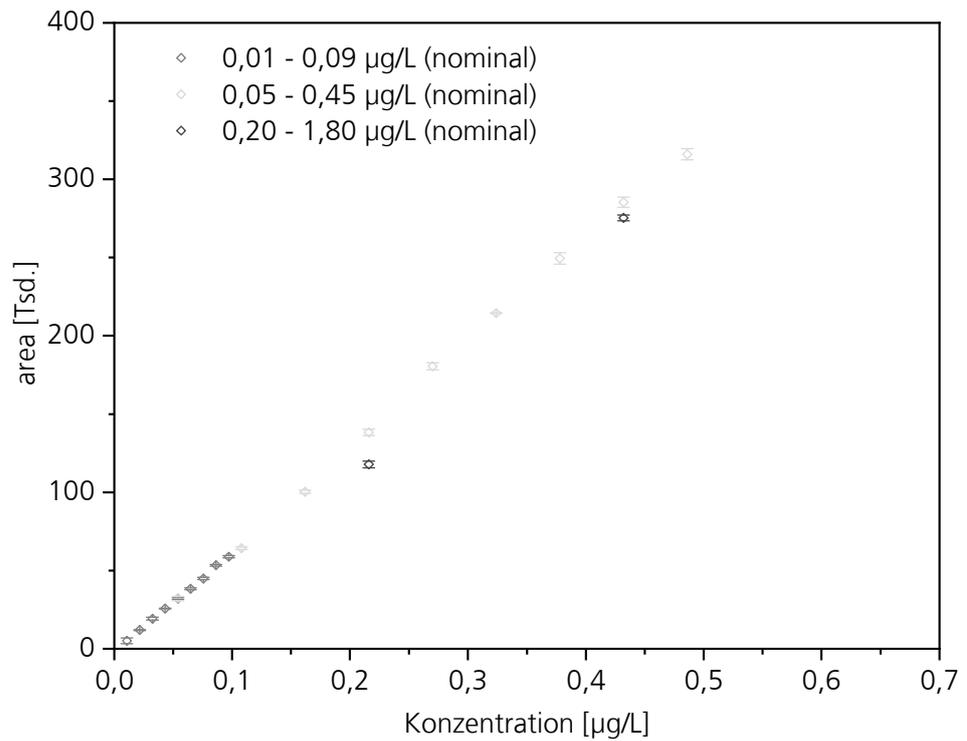


Bild 11:  
Kalibrierung von p-Kresidin (A08) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

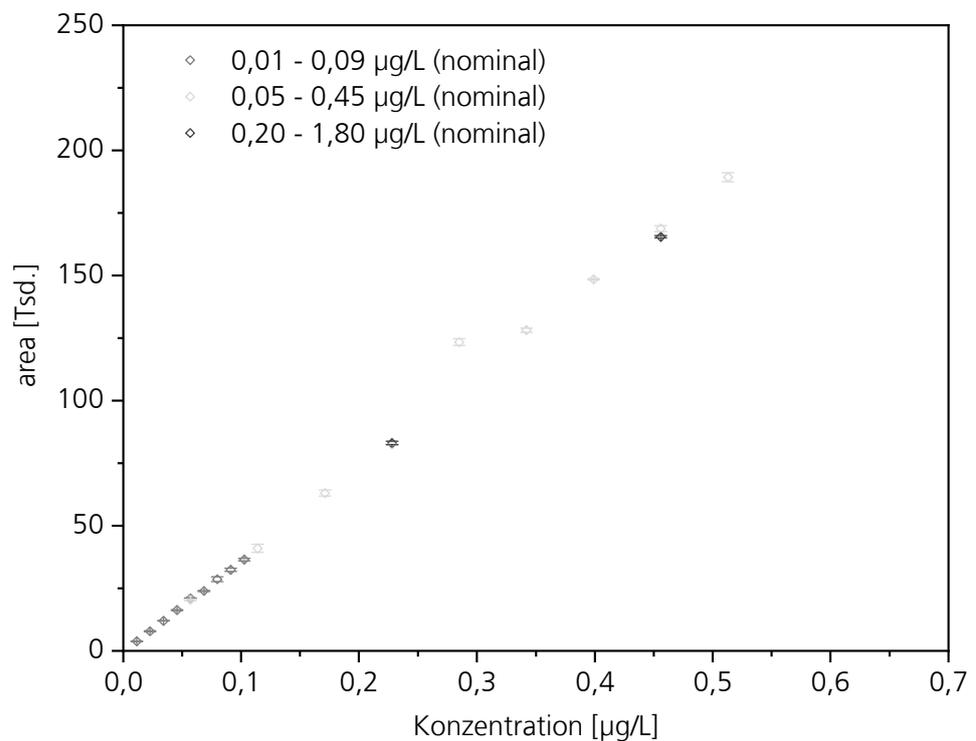


Bild 12:  
Kalibrierung von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

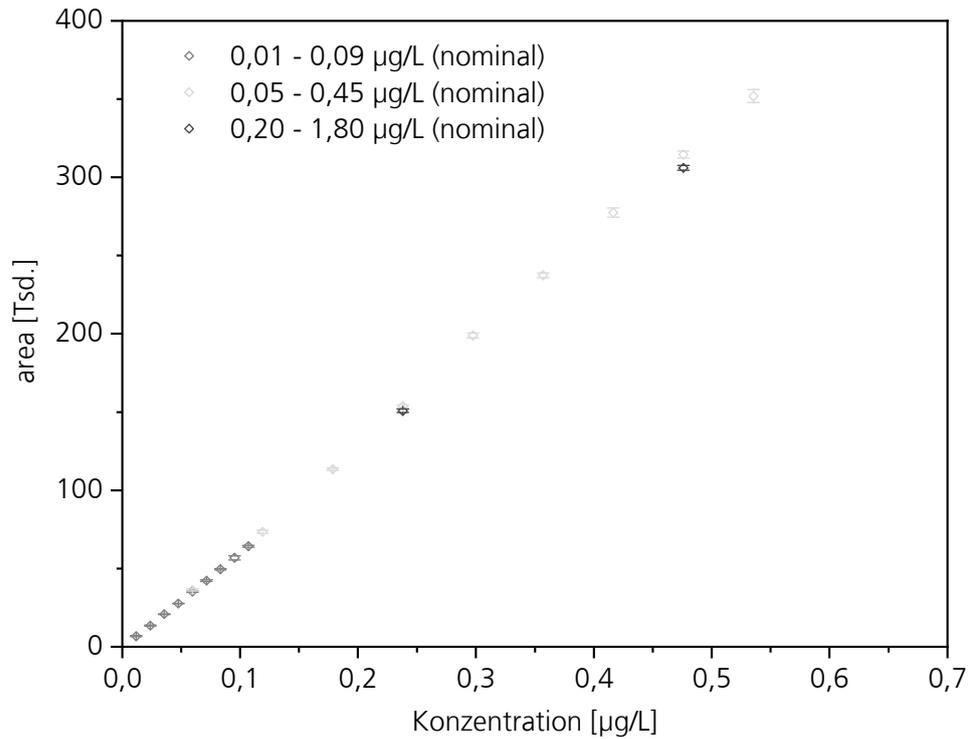


Bild 13:  
Kalibrierung von 2-Naphthylamin (A13) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

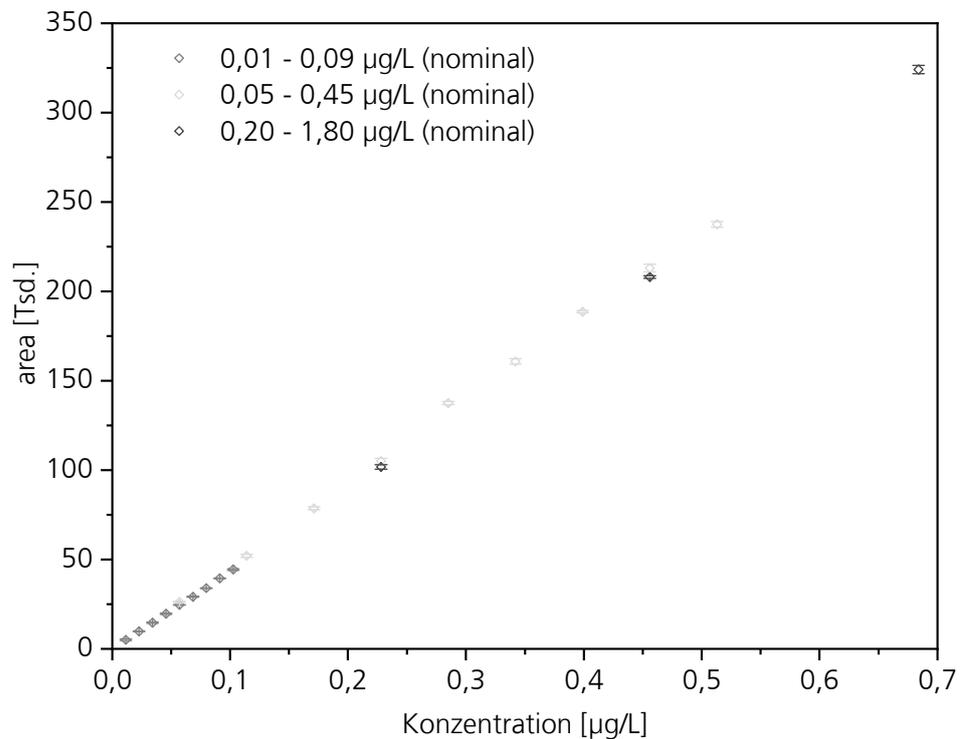


Bild 14:  
Kalibrierung von 4-Aminobiphenyl (A14) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

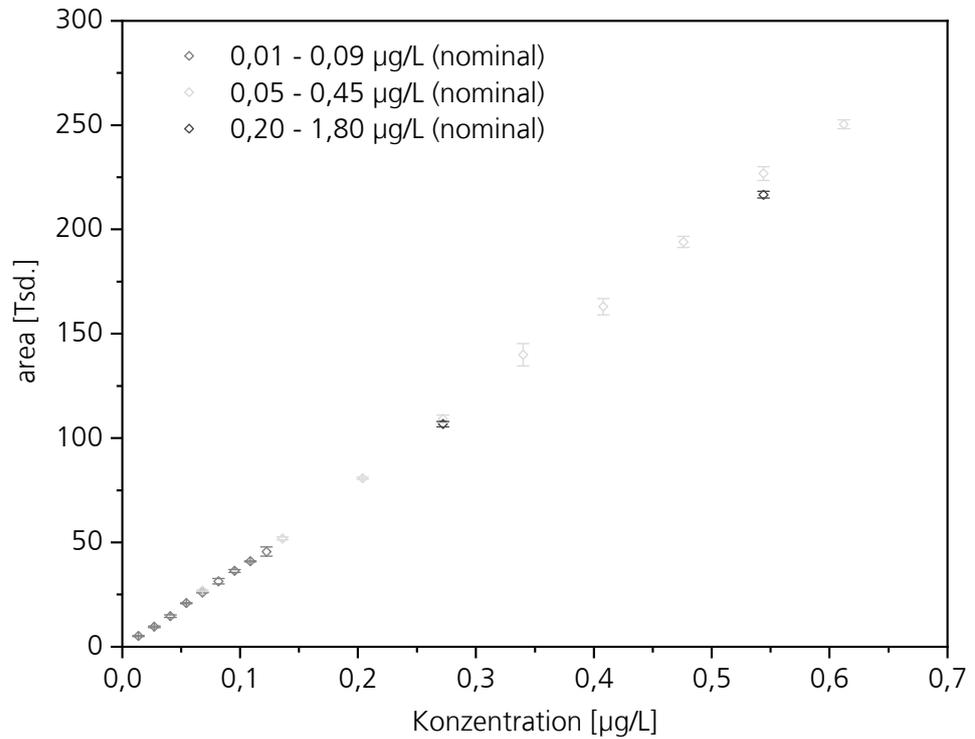


Bild 15:  
Kalibrierung von 4,4'-MDA (A16) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

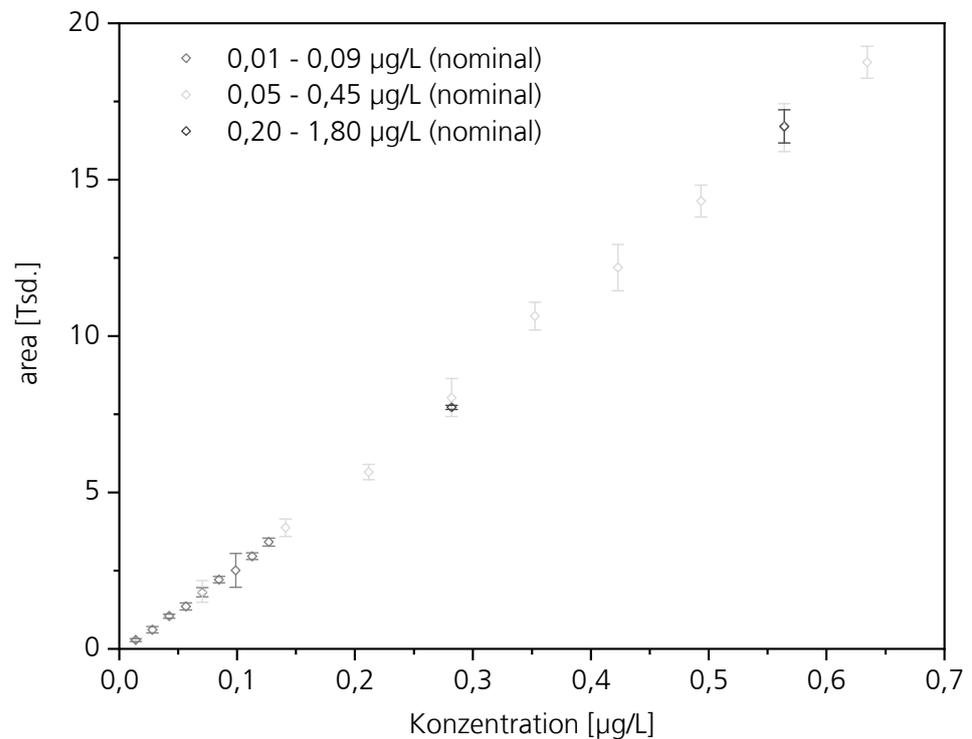


Bild 16:  
Kalibrierung von 4,4'-Oxydianilin (A17) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

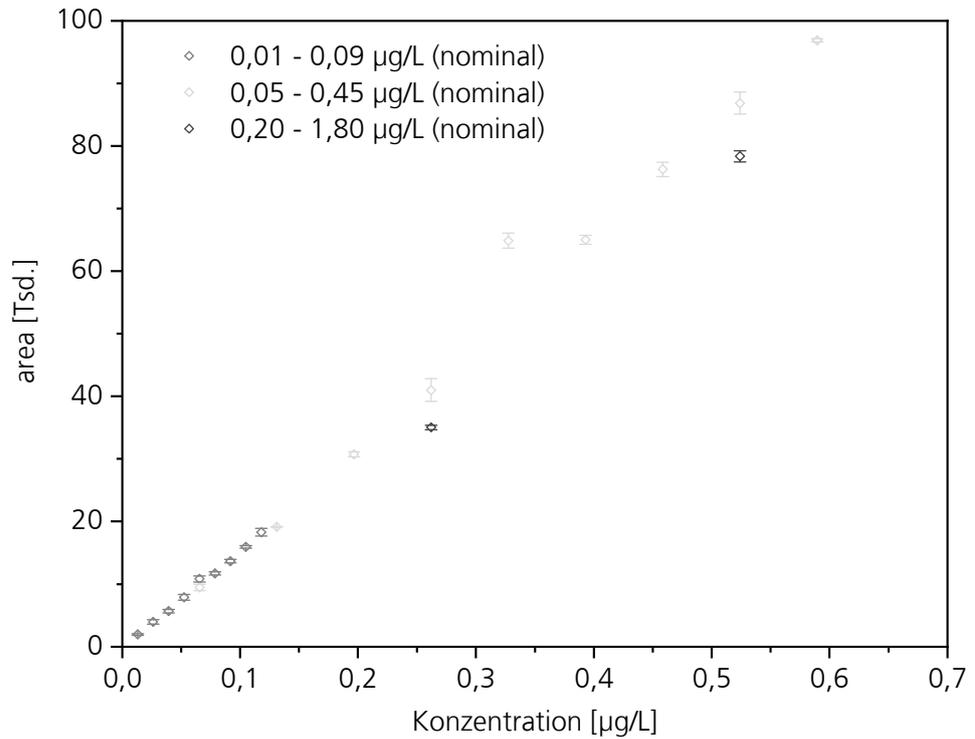


Bild 17:  
Kalibrierung von 4,4'-Thiodianilin (A19) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

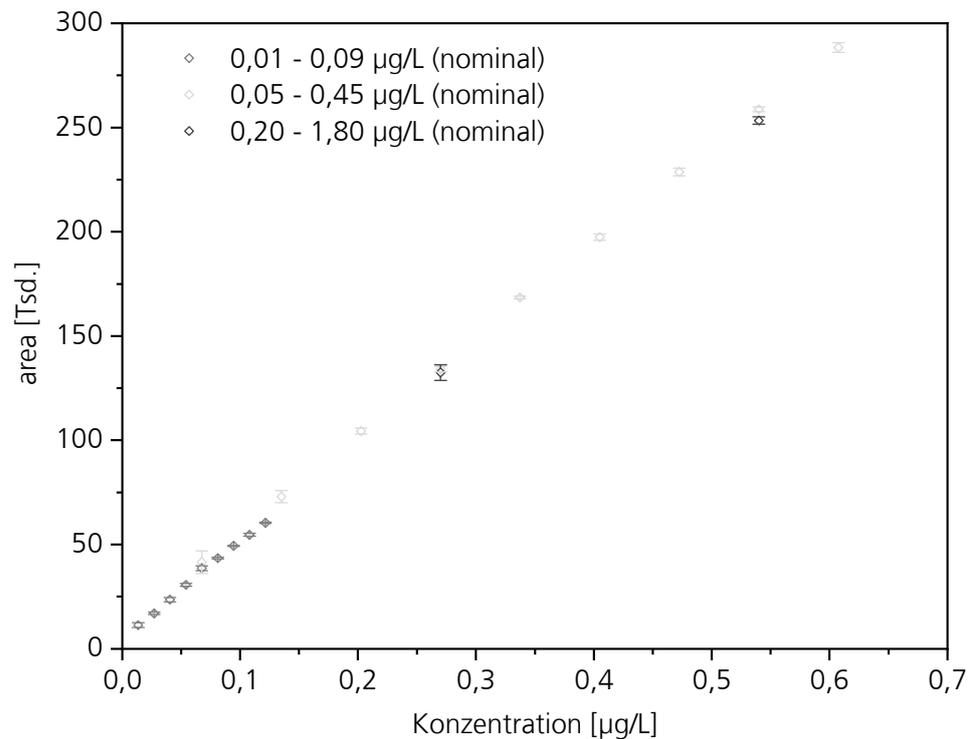


Bild 18:  
Kalibrierung von o-Aminoazotoluol (A20) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

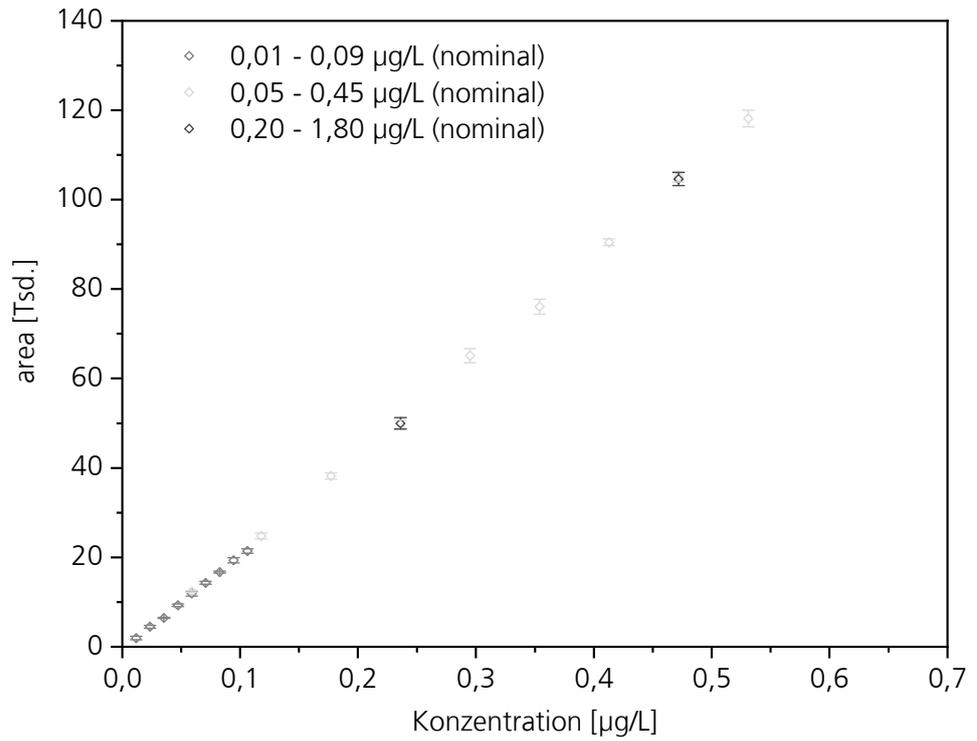


Bild 19:  
Kalibrierung von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

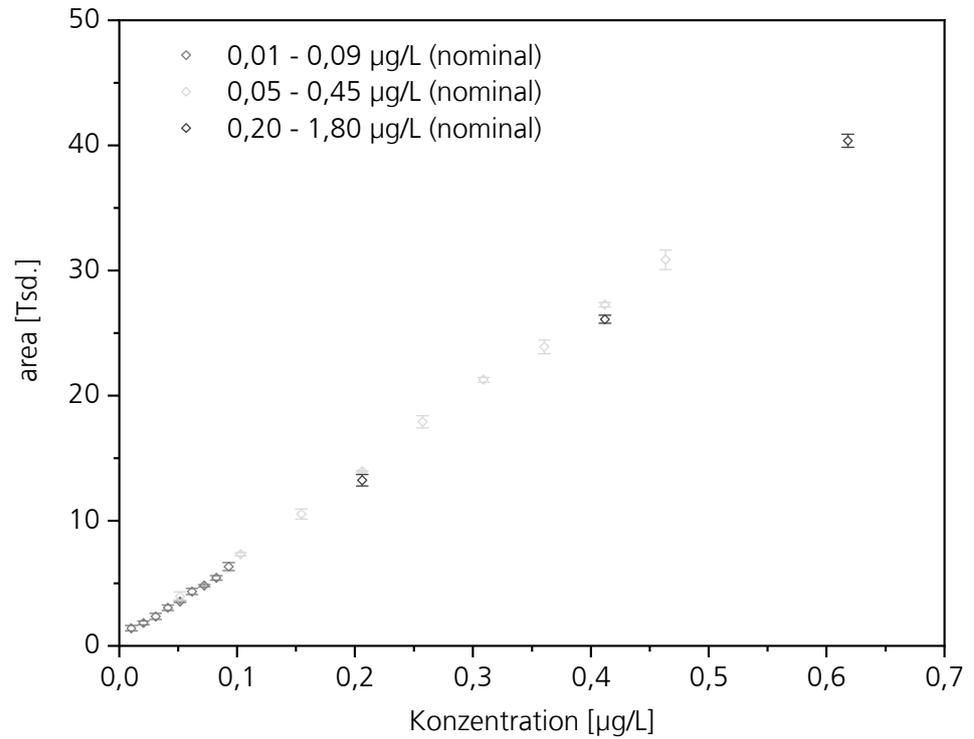


Bild 20:  
Kalibrierung von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

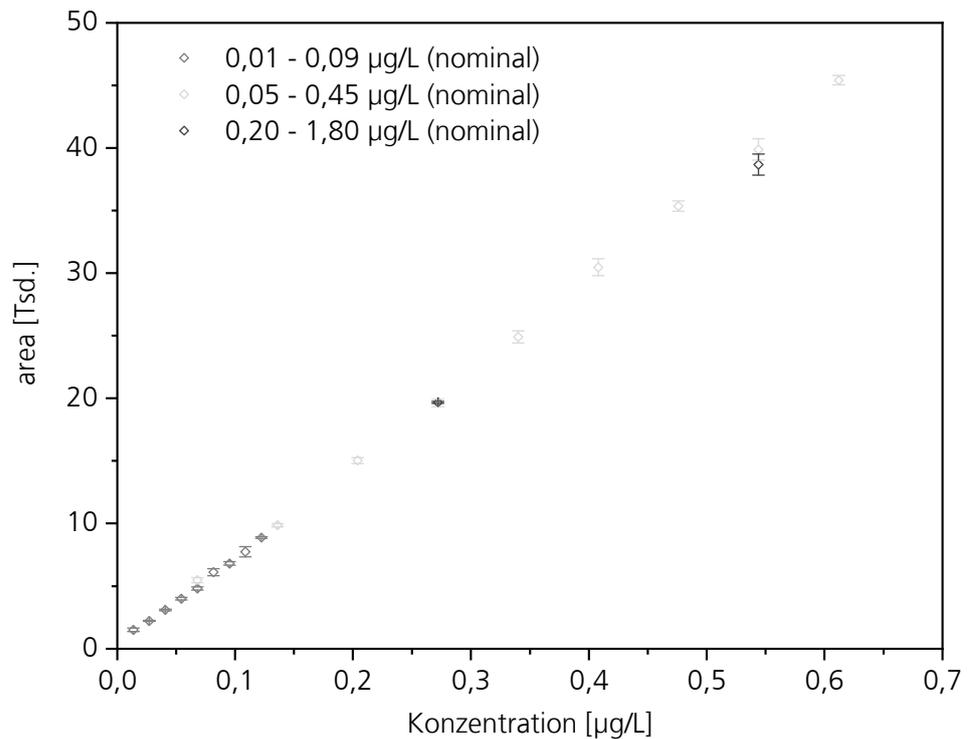


Bild 21:  
Kalibrierung von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.

#### 4.1.4 Messsignalstabilität (QC-Verlauf)

Zur Qualitätskontrolle bzw. zur Ermittlung der Stabilität des Messsignals wurden zwischen den Kalibrierblöcken Lösungen mit den (nominalen) Konzentrationen 0,2 µg/L (QC020) und 1,0 µg/L (QC100) injiziert.

In Bild 22 bis Bild 26 ist das Verhältnis aus *ermittelter* Konzentration zur *kalibrierten* Konzentration (Lauf 211 bis 237) gegen die Anzahl der Chromatographie-Läufe aufgetragen. Ein Lauf benötigt 0,29 h. 50 Läufe entsprechen 14,5 h. Ein Block von 5 Läufen (5 Konz. im Standardadditionsverfahren) benötigt 1,45 h. Ein Block von 40 Läufen (5 Konzentrationen in 8 Fraktionen) benötigt 11,6 h.

In Bild 22 ist der QC-Verlauf für 4-Chlor-2-methylanilin (A11) und 2-Naphthylamin (A13) dargestellt. Bei diesen beiden Aminen ist das Konzentrationsverhältnis über den gesamten Zeitraum bzw. für alle Läufe konstant. Das Verhalten von 4-Chlor-2-methylanilin stellt den Idealfall dar.

Bild 23 zeigt die QC-Verläufe von 11 Aminen (A07, A08, A11, A13, A14, A19, A20, A21, A22, A23) für 0,2 µg/L (rot) und 1,0 µg/L (blau). Es ist deutlich zu erkennen, dass zu Beginn eine größere Streuung auftritt, die innerhalb der ersten 40 Läufe – im Folgenden Stabilisierungsphase genannt – abnimmt. Im Anschluss an die Stabilisierungsphase wird für die folgenden 200 Läufe ein stabiler

Zustand erreicht [Ausnahmen: A04 (Bild 26), A09 (Bild 28), A15 (Bild 30) und A18 (Bild 32)].

In Bild 24 werden von den 11 Aminen aus Bild 23 die QC-Verläufe der zwei Amine dargestellt, bei denen zu Beginn die geringsten bzw. höchsten Konzentrationsverhältnisse auftreten. Während bei 4-Chloranilin (A06) das Messsignal zu Beginn abnimmt, steigt es bei 3,3'-Dichlorbenzidin (A23) zu Beginn an.

Der Signalanstieg zu Beginn einer LC-Sequenz ist bei 4,4'-MDA (A16) und bei 4,4'-Oxydianilin (A17) am stärksten ausgeprägt, siehe Bild 25. Ein stabiles, gutes Messsignal ( $\geq 90\%$ ) wird für 1,0  $\mu\text{g/L}$  4,4'-Oxydianilin erst nach 30 h bzw. 102 Läufen erreicht. Bei der geringeren Konzentration (0,2  $\mu\text{g/L}$ ) wird die stabile Phase mit gutem Messsignal bereits früher erreicht ( $\geq 98\%$  nach 18,8 h bzw. 66 Läufen und  $\geq 80\%$  nach 8,7 h bzw. 31 Läufen). Auch bei 4,4'-MDA (A16) ist der Effekt bei 1,0  $\mu\text{g/L}$  stärker ausgeprägt als bei 0,2  $\mu\text{g/L}$ , im Vergleich zum 4,4'-Oxydianilin fällt der Anstieg zu Beginn jedoch schwächer aus. Für 0,2  $\mu\text{g/L}$  4,4'-MDA liegt das Messsignal bereits ab dem ersten Lauf mit dieser Konzentration in der Nähe des Endwertes ( $\geq 90\%$  in Lauf 18; 4,9 h), für 1,0  $\mu\text{g/L}$  werden  $\geq 90\%$  bei Lauf 36 (10,4 h) erreicht.

Nach der Stabilisierungsphase ist das Messsignal bei o-Toluidin (A01) sehr stabil, während es bei 2,4-TDA (A02) stärker schwankt und zudem weiter abnimmt (Bild 26). Diese kontinuierliche Abnahme im Anschluss an die Stabilisierungsphase deutet (bei den eingesetzten geringen Konzentration von ca. 0,2 bzw. 1  $\mu\text{g/L}$ ) auf einen langsamen Abbau des 2,4-TDA hin [vergleiche mit schnellerem Abbau bei A09 (Bild 28), A15 (Bild 30) und A18 (Bild 32) in Ziffer 4.1.5]. Der Abfall des 2,4-TDA-Messsignals ist für die Analytik langsam genug, da selten Analysensequenzen über mehrere Tage laufen. Der Abbau des 2,4-TDA kann jedoch zu analytischen Messunsicherheiten führen.

Bei einer Konzentration von ca. 0,2  $\mu\text{g/L}$  blieb in der stabilen Phase bei 14 Aminen (der 15 stabilen Amine) die Abweichung in einem Korridor von  $\pm 10\%$ ; lediglich bei 2,4-TDA (A04) lag sie knapp darüber (11%).

Bei einer Konzentration von ca. 1,0  $\mu\text{g/L}$  blieb in der stabilen Phase bei 13 Aminen (der 15 stabilen Amine) die Abweichung in einem Korridor von  $\pm 10\%$ ; lediglich bei 2,4-TDA (A04) und 4,4'-Thiodianilin (A19) lag sie knapp darüber (jeweils 13%).

Die Stabilisierungsphase bis zum Erreichen der stabilen Endphase ( $100\% \pm 10\%$ ) dauert etwa 12 h bzw. etwa 40 Läufe, also inakzeptabel lange. Da je nach Amin eine Zu- oder eine Abnahme des Messsignals erfolgt, ist die Verwendung eines internen Standards (also eines weiteren Amins) nicht zielführend. Aufgrund der Messsignaländerung in der Stabilisierungsphase kann eine separate, einmalige Kalibrierung erst nach diesen 12 h bzw. 40 Läufen zu zuverlässigen Ergebnissen für alle Amine führen. Diese Voraussetzung war bei der Durchführung der Validierung gegeben, da erst ab Lauf 106 bzw. 30,7 h mit den für die Validierung verwendeten Proben gestartet wurde.

Innerhalb von 5 Läufen (5 Konzentrationen im Rahmen des Standardadditionsverfahrens) fällt die Zu- oder Abnahme des Messsignals nicht so sehr ins Gewicht. Dies ist – neben der größeren Robustheit bei Anwesenheit einer Matrix – ein weiterer Vorteil des Standardadditionsverfahrens. Dennoch ist auch für das Standardadditionsverfahren zu empfehlen, die für die Quantifizierung relevanten Läufe erst nach einer minimalen Stabilisierungsphase von 5,8 h bzw. nach 20 Läufen zu starten. Die Stabilisierungsphase kann für qualitative Messungen eingesetzt werden.

Ob sich die Stabilisierungsphase verkürzt, wenn das Verfahren als Routineverfahren eingesetzt wird (also das Analysengerät nahezu ständig in Betrieb ist), kann mit den uns vorliegenden Erfahrungen nicht beantwortet werden.

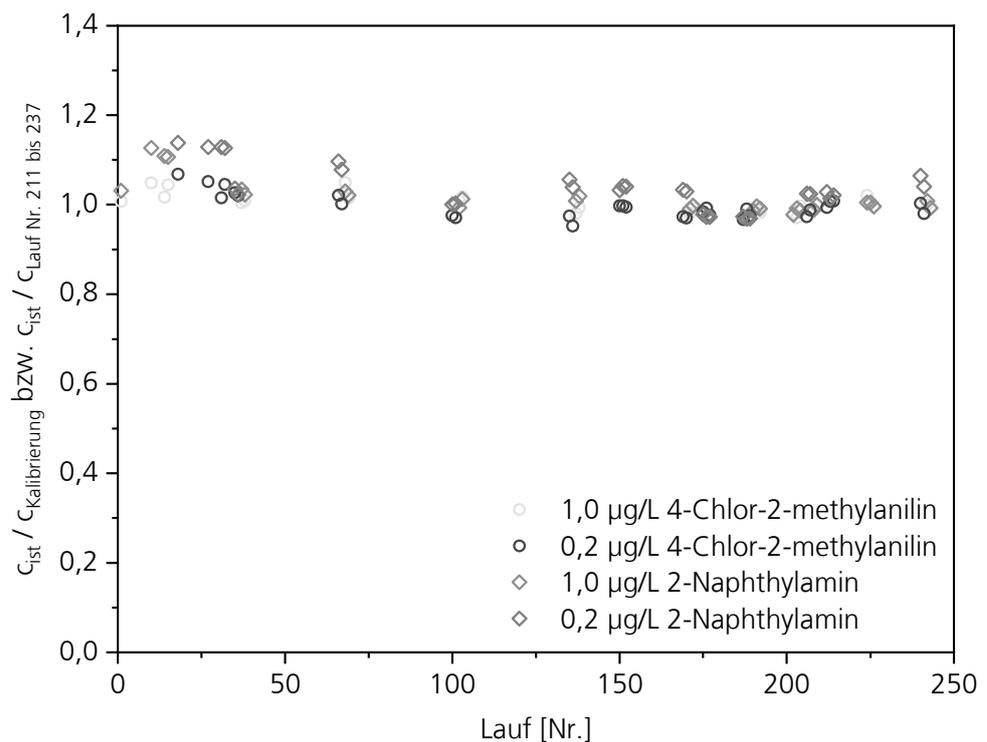


Bild 22:  
Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A11 und A13.

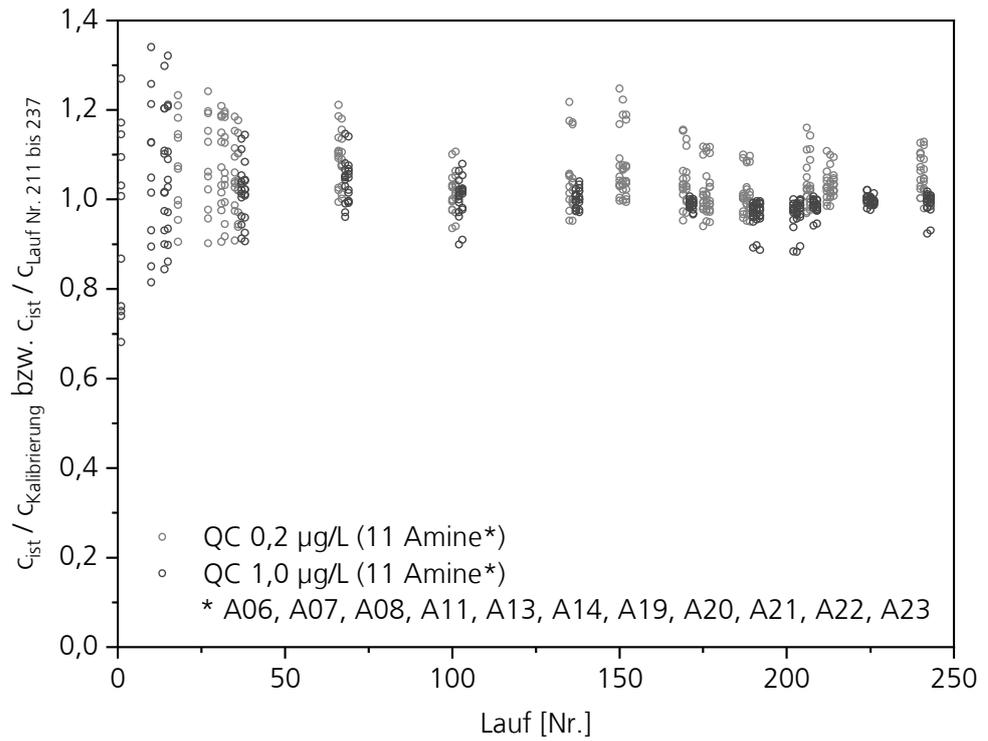


Bild 23:  
Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für 11 Amine.

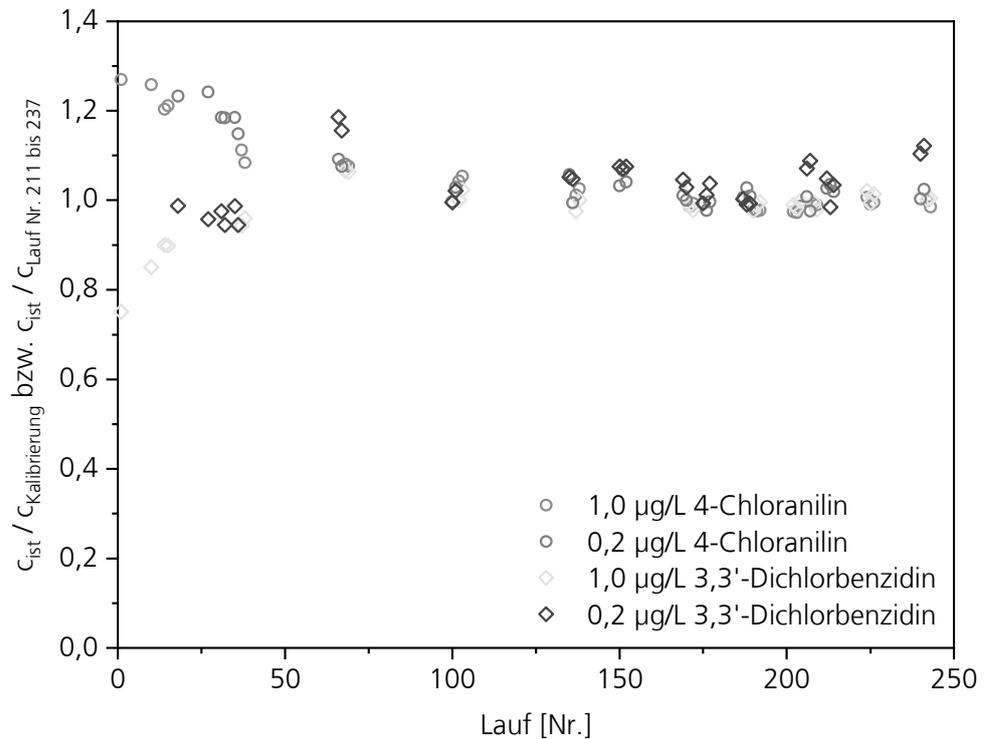


Bild 24:  
Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A06 und A23.

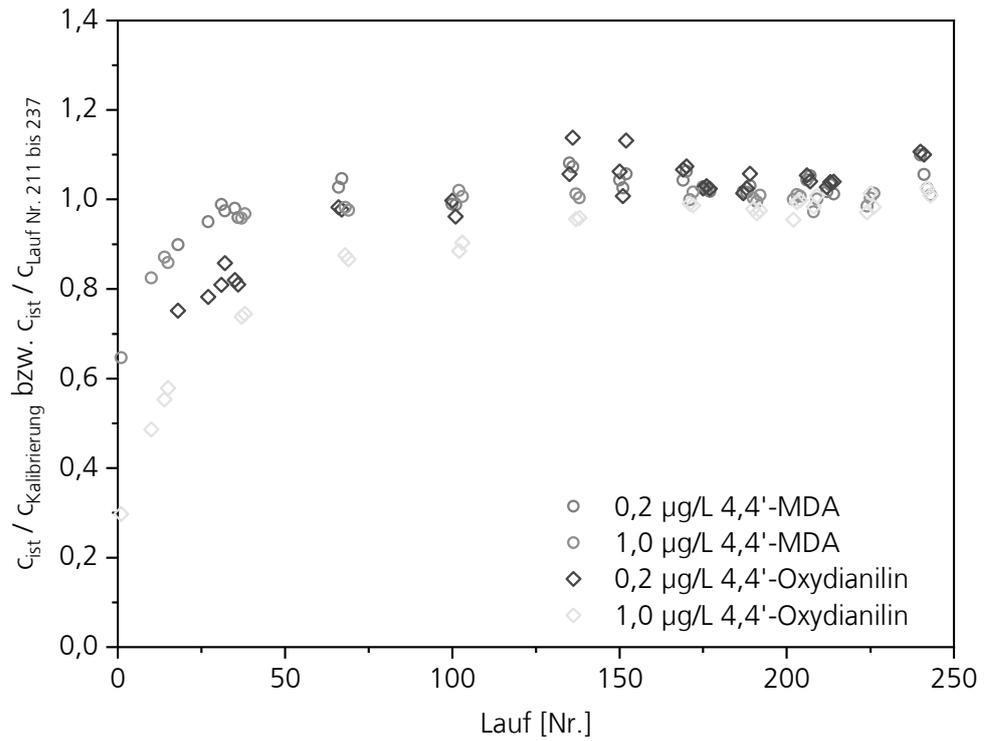


Bild 25:  
Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A16 und A17.

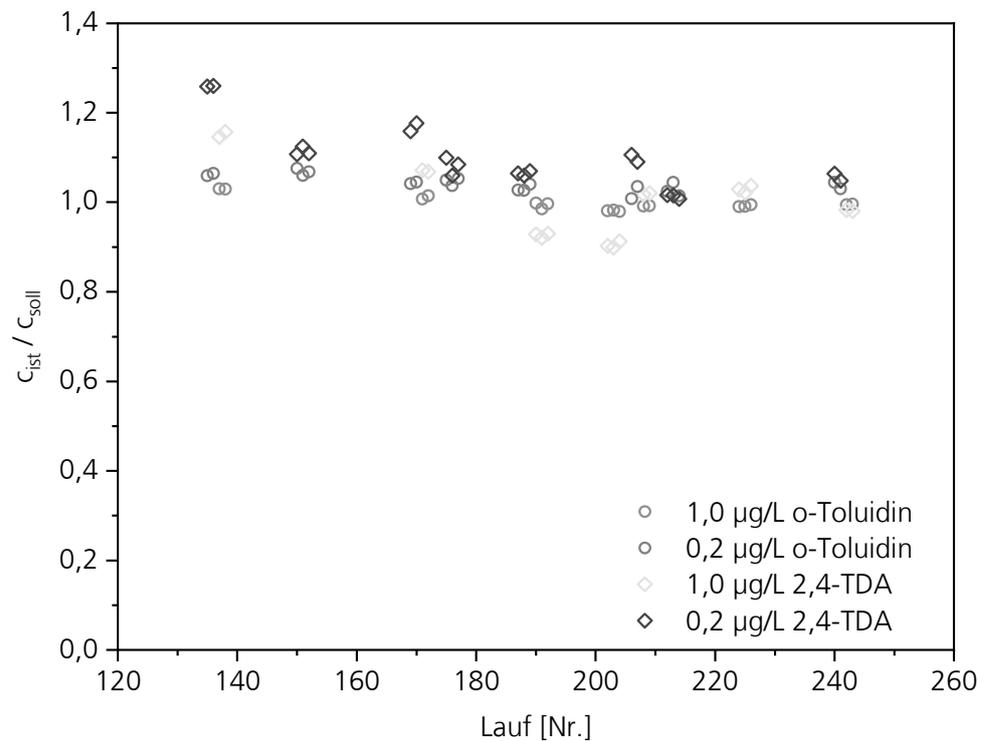


Bild 26:  
Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A01 und A02.

#### 4.1.5 2,4-Diaminoanisol (A09), Benzidin (A15) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18)

Bei drei der 18 DIBt-Amine funktioniert das Analysenverfahren nicht zuverlässig: bei 2,4-Diaminoanisol (A09), Benzidin (A15) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

Für die folgenden Messungen bzw. Ergebnisse wurden die Stammlösungen vom Juni 2021 (Jun21), vom Februar 2021 (Feb21) und vom Dezember 2020 (Dez20) eingesetzt. Für die Untersuchung des QC-Verlaufs wurde die Stammlösung Jun21/S5 eingesetzt. Mit den Stammlösungen Feb21/S5 und Dez20/S5 wurde die Stabilität der drei Amine in den Stammlösungen untersucht. Die anderen 20 Amine waren bei dieser Versuchsreihe nicht zugegen.

Für eine bessere mathematische Analyse sind in Bild 28, Bild 30 und Bild 32 die Flächenintegrale normiert, indem für jede Konzentration das Flächenintegral des jeweils ersten Laufs auf 100 % gesetzt wurde. Die x-Achse ist normiert, indem für jede Konzentration der Referenz-Lauf auf 0 gesetzt wurde. Der exponentielle Abfall vom Startwert (100 %) auf null (0 %) ist ein Spezialfall der Formel (1). Formel (1) entspricht einem exponentiellen Abfall mit einer asymptotischen Annäherung an einen Endwert zwischen 0 und dem Startwert. Die Variablen für die folgenden, an die jeweiligen Messdaten gefitteten Kurven sind in Bild 28, Bild 30 und Bild 32 aufgeführt.

$$y = \left[ \frac{(C_{\text{Start}} - C_{\text{Abbau}})}{C_{\text{Start}}} + \frac{C_{\text{Abbau}}}{C_{\text{Start}}} \cdot e^{\left( -\frac{(\Delta x \cdot 0,29 \frac{h}{\text{Lauf}})}{\tau / \ln(2)} \right)} \right] \cdot 100 \% \quad (1)$$

Zur Vereinfachung kann Formel (1) als Formel (2) oder Formel (3) verwendet werden.

$$y = \left[ \frac{(C_{\text{Start}} - C_{\text{Abbau}})}{C_{\text{Start}}} + \frac{C_{\text{Abbau}}}{C_{\text{Start}}} \cdot 2^{\left( -\frac{(\Delta x \cdot 0,29 \frac{h}{\text{Lauf}})}{\tau} \right)} \right] \cdot 100 \% \quad (2)$$

$$y = \left[ \frac{C_{\text{Ende}}}{C_{\text{Start}}} + \frac{C_{\text{Abbau}}}{C_{\text{Start}}} \cdot 2^{\left( -\frac{(\Delta x \cdot 0,29 \frac{h}{\text{Lauf}})}{\tau} \right)} \right] \cdot 100 \% \quad (3)$$

In Bild 27 sind die Flächenintegrale für verschiedene Konzentrationen von 2,4-Diaminoanisol (A09) gegen die Laufnummer aufgetragen. Der schnelle Abfall des Messsignals bzw. des Flächenintegrals ist deutlich zu erkennen.

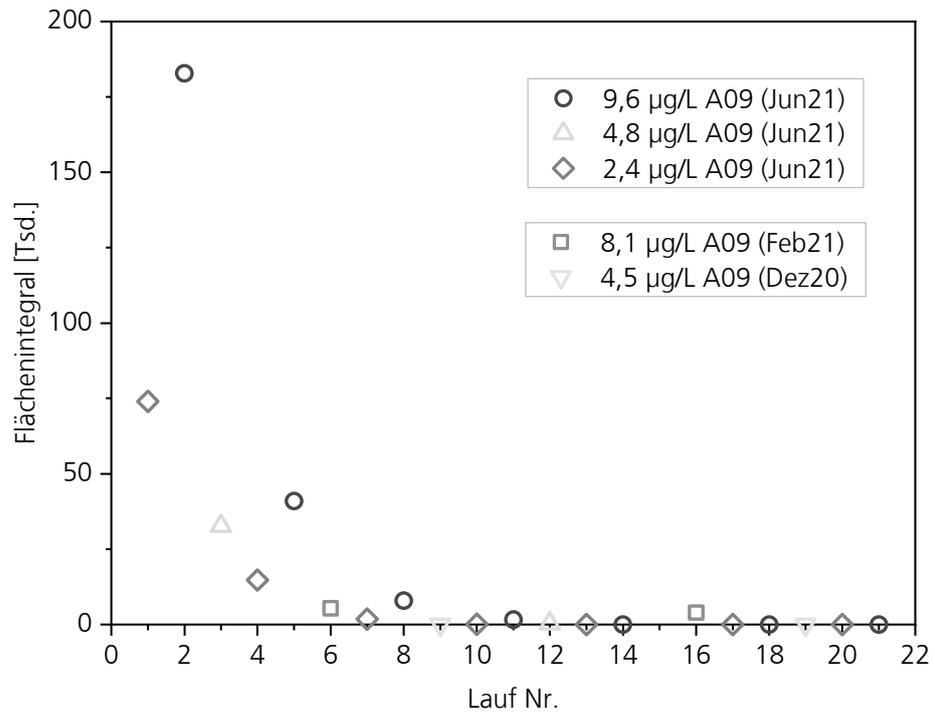


Bild 27:  
Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für diverse Konzentrationen von 2,4-Diaminoanisole (A09).

Ein exponentieller Abfall bis zur Nulllinie mit einer Halbwertszeit von 23 min (das entspricht 1,3 Läufen) – und unabhängig von der jeweiligen Startkonzentration – beschreibt die Abnahme des Messsignals in Bild 28 sehr gut. Das bedeutet, dass 2,4-Diaminoanisole (A09) so schnell abgebaut wird bzw. werden kann, dass eine Analyse dieses Amins mit der vorgestellten UPLC-MS/MS-Methode nicht möglich ist (bzw. nicht zuverlässig ist, siehe Bild 88).

Aufgrund der Instabilität des 2,4-Diaminoanisols (A09) während der Analyse kann keine Aussage über die Stabilität in den Stammlösungen getroffen werden („Feb21“ und „Dez20“ in Bild 27).

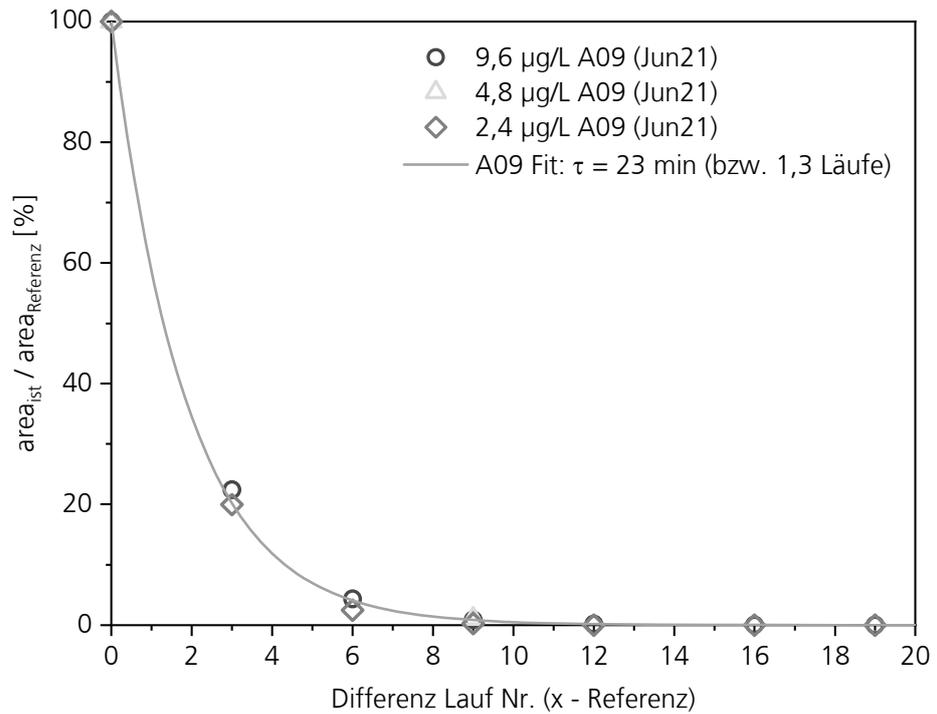


Bild 28:

Relativer Verlauf des Messsignals (erste Messung entspricht 100 %) für 2,4-Diaminoanisole (A09).

In Bild 29 sind die Flächenintegrale für verschiedene Konzentrationen von Benzidin (A15) gegen die Laufnummer aufgetragen. Es ist ein langsamer Abfall des Messsignals bzw. des Flächenintegrals zu erkennen.

Des Weiteren ist in Bild 29 zu erkennen, dass die Lösungen, die mit alten Stammlösungen (Feb21 und Dez20) angesetzt wurden, trotz ähnlicher (berechneter bzw. erwarteter) Konzentrationen wesentlich geringere Flächenintegrale aufweisen. Auch wenn eine Quantifizierung wegen der Instabilität des Amins während der Analyse schwierig ist, so ist zumindest eindeutig, dass Benzidin (A15) auch in den Stammlösungen instabil ist (die Berechnung ergibt ca. 50 bis 60 % Abbau).

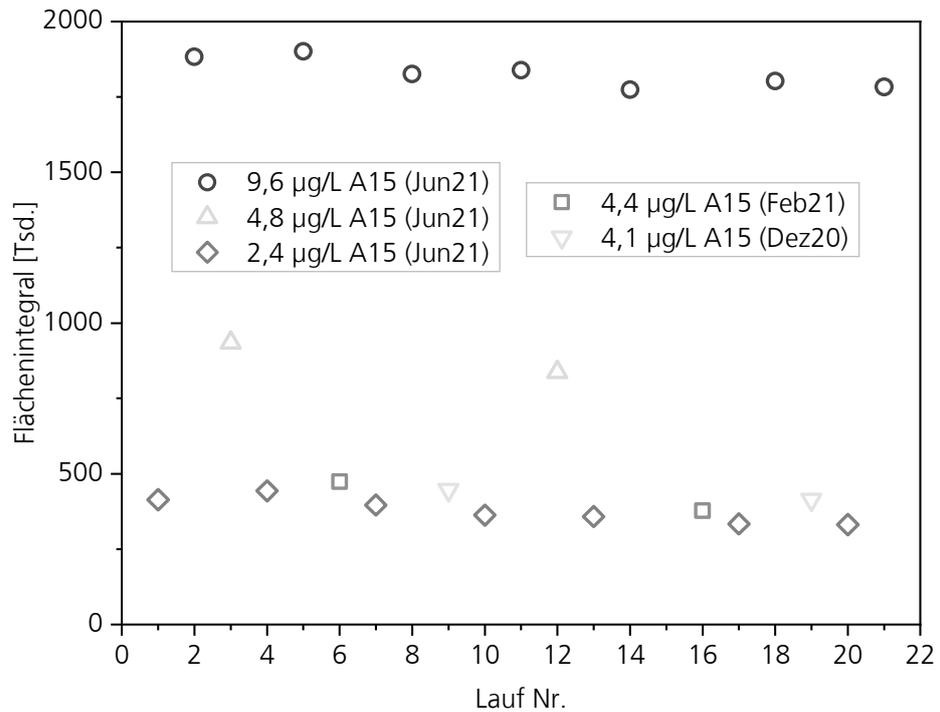


Bild 29:  
Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für 5 Konzentrationen von Benzidin (A15).

In Bild 30 entspricht der Verlauf für die höchste Benzidin-Konzentration (9,6 µg/L) einem exponentiellen Abfall von 9,6 µg/L auf 8,75 µg/L mit einer Halbwertszeit von etwa 3 h (das entspricht 10,3 Läufen). Bei geringeren Konzentrationen erfolgt der Abbau mit einer ähnlichen Halbwertszeit (2 h für 2,4 µg/L bzw. 3 h für 1,2 µg/L Startkonzentration), jedoch auf einen anderen relativen Endwert. Die absolute Differenz (in µg/L) zwischen Start und Endwert ist wiederum bei allen drei Startkonzentrationen ähnlich [0,85 µg/L bei 9,6 µg/L, 0,78 µg/L für 2,4 µg/L und 1,2 µg/L für 1,2 µg/L Startkonzentration]. Das bedeutet, dass Benzidin (A15) in Konzentrationen unter 1 µg/L vor der Analyse der Lösung komplett oder teilweise abgebaut ist (siehe auch Bild 33 und Bild 92). Mit der vorgestellten UPLC-MS/MS-Methode ist eine Analyse dieses Amins für Konzentrationen unter 1 µg/L nicht zuverlässig bzw. nicht möglich. Bei hohen Konzentrationen (2 - 10 µg/L) liefert die Analytik gute Resultate (Bild 33).

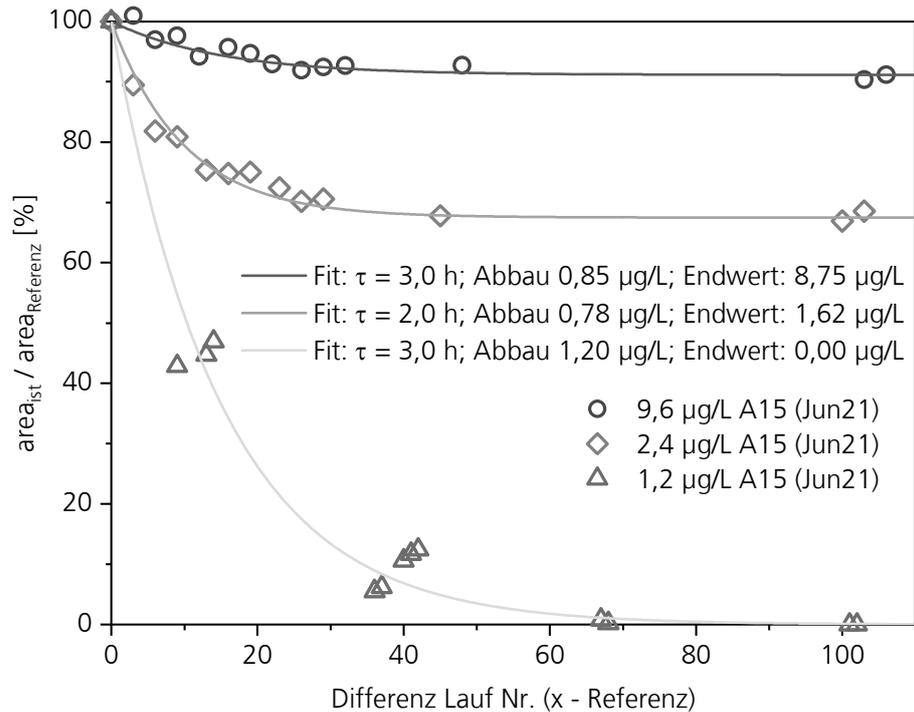


Bild 30:

Relativer Verlauf des Messsignals (bei jeder Konzentration entspricht erste Messung 100 %) für Benzidin (A15).

In Bild 31 sind die Flächenintegrale für verschiedene Konzentrationen von 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) gegen die Laufnummer aufgetragen. Es ist ein langsamer Abfall des Messsignals bzw. des Flächenintegrals zu erkennen.

Die Messdaten von 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) in Bild 32 können mit einem exponentiellen Abfall auf einen stabilen Endwert mit einer Halbwertszeit von 7 bzw. 8 h (das entspricht etwa 26 Läufen) beschrieben werden. Bei der vierfach höheren Konzentration (9,3 µg/L vs. 2,3 µg/L) wird etwa doppelt so viel (3,0 µg/L vs. 1,6 µg/L) 3,3'-Dimethylbenzidin abgebaut. Der Abbau erfolgt einerseits langsamer als beim Benzidin (A15) ( $\tau = 7$  bis 8 h vs.  $\tau = 2$  bis 3 h), andererseits wird ein größerer Anteil des in der Lösung vorhandenen Amins abgebaut [70 % bei 2,3 µg/L 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) vs. 33 % bei 2,4 µg/L Benzidin (A15)]. Das Abbauverhalten hat eine unzuverlässige Analytik zu Folge (siehe auch Bild 34 und Bild 95).

In Bild 31 ist außerdem zu erkennen, dass die Lösungen, die mit alten Stammlösungen (Feb21 und Dez20) angesetzt wurden, trotz ähnlicher (berechneter bzw. erwarteter) Konzentration wesentlich geringere Flächenintegrale aufweisen. Auch wenn eine Quantifizierung wegen der Instabilität während der Analyse schwierig ist, so ist zumindest eindeutig, dass 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) auch in den Stammlösungen instabil ist (die Berechnung ergibt ca. 50 bis 60 % Abbau).

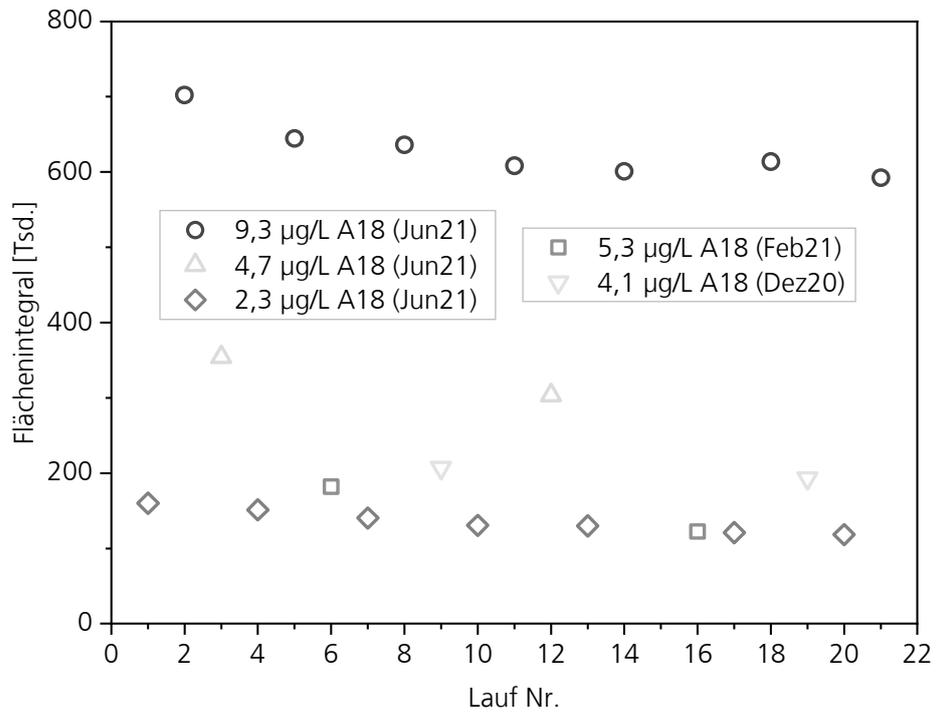


Bild 31: Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für diverse Konzentrationen von 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

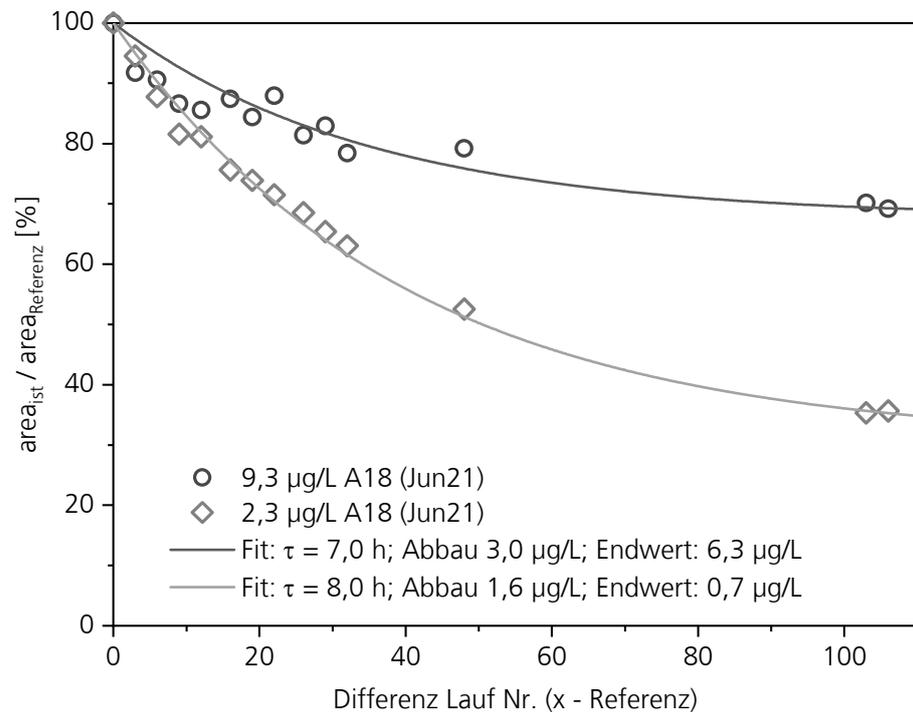


Bild 32: Relativer Verlauf des Messsignals (bei jeder Konzentration entspricht erste Messung 100 %) für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

In Tabelle 12 sind die Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Geradensteigungen m der Kalibriergeraden für den (nominalen) Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1,8 µg/L für die drei instabilen Amine A09, A15 und A18 (Lauf Nr. 37 bis 66) sowie zum Vergleich für drei weitere, ausgewählte Amine (A06, A11 und A17; stabile Amine Lauf Nr. 211-237) aufgeführt. Bei 2,4-Diaminoanisol (A09) ist aufgrund des schnellen Abbaus kein Messsignal für eine Auswertung vorhanden. Tabelle 13 enthält die Ergebnisse für die Kalibriergeraden im Bereich 2 bis 10 µg/L (instabile Amine, Lauf Nr. 73 bis 102) bzw. 1 bis 7 µg/L (Amine A06, A11 und A17 zum Vergleich; stabile Amine Lauf Nr. 50 bis 70).

Tabelle 12:

Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Geradensteigungen der Kalibriergeraden ausgewählter Amine (A15, A18 u.a.) bei einer nominalen Konzentration von 0,2 bis 1,8 µg/L.

IBP-Nr.	Stoffname (IBP)	NWG [µg/L]	BG [µg/L]	m <sub>0,2-1,8</sub> [Tsd./pg]	optimale Regres.	lin. Repr. vertretbar
A06	4-Chloranilin	0,03	0,09	3,9	linear	ja
A09	2,4-Diaminoanisol *	--	--	--	--	--
A11	4-Chlor-2-methylanilin	0,04	0,12	14,9	linear	ja
A15	Benzidin	0,36	0,92	5,4	quadr.	nein
A17	4,4'-Oxydianilin	0,05	0,16	1,4	linear	ja
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	0,36	0,93	1,5	quadr.	nein

\* Kein Messsignal, daher keine Auswertung möglich.

Tabelle 13:

Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Geradensteigungen der Kalibriergeraden ausgewählter Amine bei einer nominalen Konzentration von 1 bis 7 µg/L (A06, A11, A18) bzw. 2 bis 10 µg/L (A15, A18).

IBP-Nr.	Stoffname (IBP)	NWG [µg/L]	BG [µg/L]	m <sub>1-7 o. 2-10</sub> [Tsd./pg]	optimale Regres.	lin. Repr. vertretbar
A06	4-Chloranilin	0,29	0,93	4,1	linear	ja
A09	2,4-Diaminoanisol *	--	--	--	--	--
A11	4-Chlor-2-methylanilin	0,20	0,66	14,7	linear	ja
A15	Benzidin	0,33	1,05	8,1	linear	ja
A17	4,4'-Oxydianilin	0,31	1,01	1,6	linear	ja
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	0,46	1,44	2,5	linear	ja

\* Kein Messsignal, daher keine Auswertung möglich.

Benzidin (A15) weist prinzipiell eine hohe Detektionsempfindlichkeit bzw. Geradensteigung m auf, sie liegt über der Steigung für 4-Chloranilin (NWG

0,0037 µg/L, BG 0,012 µg/L) (0,2 bis 1,8 µg/L s. Tabelle 12; 2 bis 10 µg/L s. Tabelle 13). Bei Benzidin (A15) ist der Abbau des Analyten während der Chromatographie-Sequenz, insbesondere bei Konzentrationen unter 1 µg/L, der limitierende Faktor für die Analytik. Diese Umstände erklären, warum Benzidin (A15) in Real-Proben und/oder in hohen Konzentrationen häufiger detektiert wurde/wird, obwohl die Kalibrierung bei den angestrebten Konzentrationen (< 1 µg/L) regelmäßig eine schlechte Qualität aufweist. Der (in µg/L) konstante Abbau in den Kalibrierlösungen ist die Ursache für die ausgeprägt quadratische Regression im Konzentrationsbereich bis 2 µg/L (Bild 33 und Bild 92).

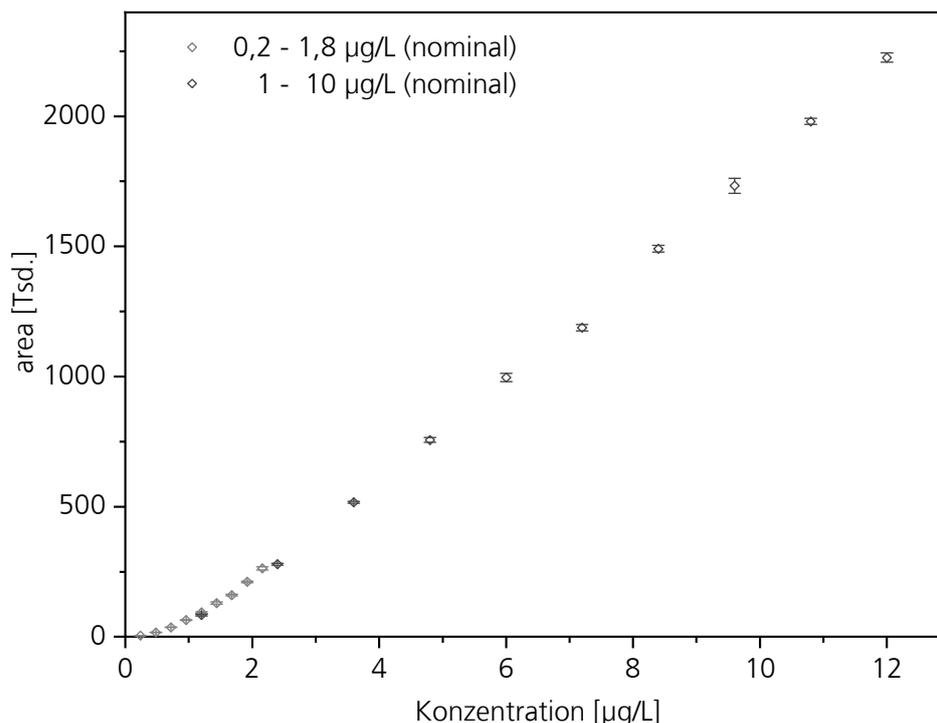


Bild 33: Kalibrierkurve für Benzidin (A15). Im Konzentrationsbereich bis 1,8 µg muss eine quadratische Regression verwendet werden. Ab 2 µg/L ist der Verlauf linear.

Bei 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) ist die Geradensteigung bzw. Detektionsempfindlichkeit ähnlich wie bei 4,4-Oxydianilin (A17), das von den 15 in Ziffer 4.1.3 behandelten Aminen bereits die geringste Geradensteigung aufweist (0,2 bis 1,8 µg/L s. Tabelle 12; 2 bis 10 µg/L s. Tabelle 13). Während bei 4,4-Oxydianilin (A17) der Massenübergang extrem selektiv ist und dadurch das Grundrauschen sehr gering ist, reicht beim 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) die Steigung bzw. die Empfindlichkeit nicht aus, um die benötigten Bestimmungsgrenzen (etwa 0,05 µg/L) zu erreichen. Hinzu kommt noch der Abbau des Analyten während der Chromatographie-Sequenz. Der Abbau in den Kalibrierlösungen ist die Ursache für die ausgeprägt quadratische Regression im Konzentrationsbereich bis 2 µg/L (Bild 34 und Bild 95).

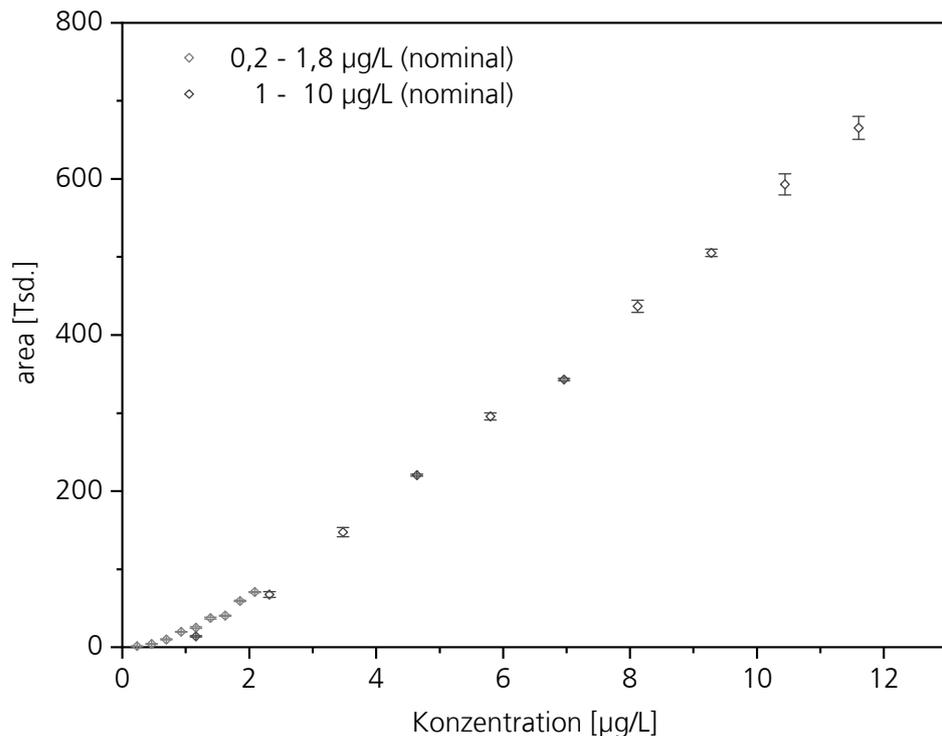


Bild 34:  
Kalibrierkurve für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18). Im Konzentrationsbereich bis 1,8 µg muss eine quadratische Regression verwendet werden, ab 2 µg/L ist der Verlauf linear.

#### 4.1.6 Stabilität der Stammlösungen

In den Stammlösungen – d. h. in einer Lösungsmittelmischung aus 35 % Acetonitril, 65 % Reinstwasser und 0,054 % Ameisensäure und bei einer Konzentration von etwa 0,2 mg/mL bzw. 200 ng/µL – und bei 6 °C im Kühlschrank gelagert, sind die 15 stabilen Amine (mindestens) 15 Monate lang verwendbar. Lediglich bei 2,4-TDA (A04) deuten die Ergebnisse auf einen Verlust hin (Bild 65). Stammlösungen mit 2,4-TDA (A04) können 6 Monate lang eingesetzt werden. In Bild 64 bis Bild 78 im Anhang A.2 ist für die 15 stabilen Amine die Wiederfindung in Prozent gegen die Lagerungsdauer aufgetragen. Zur besseren Übersichtlichkeit des Berichts sind die Diagramme im Anhang A.2 zusammengestellt. Bei 5 Aminen ist die Wiederholbarkeit schlechter, weshalb die Daten stärker schwanken (< 38 %, s. A08 in Bild 68; i.d.R. ca. 20%, s. A11 in Bild 69 / A13 in Bild 70 / A19 in Bild 74 und A22 in Bild 77). Die Daten geben jedoch keine Hinweise auf einen Abbau bzw. Verlust an Analyt (vielmehr sind die Wiederfindungen in den ältesten Stammlösungen vom März 2020 erhöht). Eine ideale Wiederfindung in den Stammlösungen ist bei o-Toluidin (A01; Bild 64), 4-Chloranilin (A06; Bild 66), 2,4,5-Trimethylanilin (A07; Bild 67), 4,4'-MDA (A16; Bild 72), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21; Bild 76) und bei 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23; Bild 78) gegeben.

## 4.2 Methodenvergleich GC-MS vs. UPLC-MS/MS

### 4.2.1 Amine in Reinstwasser

Für den Methodenvergleich zwischen GC-MS und UPLC-MS/MS wurden 4 verschiedene Aminmischungen (A, B, C und D; siehe Ziffer 3.5 und Bild 4) angesetzt. Zwischen Zugabe der Mischungen und der Analyse mittels GC-MS lagen 4 Kalendertage. Bei der UPLC-MS/MS-Analyse lagen 6 Kalendertage zwischen Zudosierung bzw. Herstellung der Proben und deren Analyse.

Um Verluste während der 6-tägigen Lagerung (im Kühlschrank) zu erfassen, wurden mit den Mischungen A bis D Lösungen frisch angesetzt (mit gleicher Verdünnung wie in den Proben). Um die analytischen Fehler möglichst gering zu halten, wurden die jeweiligen frisch verdünnten Lösungen und die entsprechenden Proben (Amine in Reinstwasser) direkt hintereinander analysiert und die Wiederfindung direkt (also ohne Kalibrierung) miteinander verglichen. In Bild 79 bis Bild 82 sind die Wiederfindungen für die Mischungen A bis D dargestellt. Bis auf die instabilen Amine (s. Ziffer 4.1.5) 2,4-Diaminoanisol (A09), Benzidin (A15) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) ist die Wiederfindung sehr gut. Während der Lagerung sind 15 der 18 DIBt-Amine (sowie die 5 zusätzlichen Isomere) vollständig erhalten geblieben. Zur besseren Übersichtlichkeit des Berichts sind die Diagramme im Anhang A.3 zu finden.

Die Amin-Mischungen A bis D enthalten absichtlich sehr unterschiedliche Konzentrationen an den verschiedenen Aminen. In einer Mischung kann von einem Amin eine hohe Konzentration vorhanden sein und von einem anderen eine niedrige. Des Weiteren waren Isomere als Störkomponenten enthalten. Bei der Auswertung des Methodenvergleichs wurden die Resultate aus der GC-Analytik und der UPLC-MS/MS-Analytik so sortiert, dass jeweils

- die höchsten Konzentrationen (zwischen 1,3 und 4,7 µg/L; Bild 35)
- die zweithöchsten Konzentrationen (zw. 0,9 und 2,6 µg/L; Bild 36)
- die zweitniedrigsten Konzentrationen (zw. 0,4 und 1,2 µg/L; Bild 37)
- die niedrigsten Konzentrationen (zw. 0,1 und 0,3 µg/L; Bild 38)

in je einem Balkendiagramm zusammengefasst sind. Die nach Aminen sortierten Ergebnisse sind im Anhang A.5 in Bild 101 bis Bild 118 dargestellt.

In Bild 35 bis Bild 38 sind die aus den Einwaagen (der Stammlösungen Mrz20, Dez20 und Feb21 aus Tabelle 3) und den verwendeten Verdünnungen berechneten Konzentrationen als gelbe Balken dargestellt. Die mittels GC-MS ermittelten Resultate (je Konzentration zwei Proben) sind in violett (GC-1) und rot (GC-2) dargestellt. Bei der UPLC-MS/MS-Analytik wurde sowohl die Gradientenmethode (cyanfarbene Balken; LC-g) als auch die isokratische Methode (grüne

Balken; LC-i) eingesetzt. Bei der UPLC-Analytik wurde ebenfalls eine Doppelbestimmung durchgeführt, die entsprechenden Fehlerbalken sind in den Diagrammen enthalten. Wenn kein Fehlerbalken zu erkennen ist, dann liegen die beiden Werte zu dicht beieinander, um den Fehlerbalken zu erkennen. Lediglich in Bild 38 zeigt der schraffierte cyanfarbene Balken im Diagramm bei Benzidin das Ergebnis nur einer Probe (in der zweiten Probe war kein Benzidin nachweisbar).

Bei der isokratischen Methode werden die Chlor-2-methylaniline A10 (3-Chlor) und A11 (4-Chlor) nicht getrennt (Tabelle 7). Da beim Methodenvergleich (Ziffer 3.3) auch 3-Chlor-2-methylanilin als Störkomponente zugegeben wurde (Bild 4), sind für 4-Chlor-2-methylanilin bei der isokratischen Methode in Bild 35 bis Bild 38 (grüne Balken) keine Resultate dargestellt.

Die instabilen Amine sind in Bild 35 bis Bild 38 mit einem Stern markiert. Die Ergebnisse zu den instabilen Aminen werden jeweils im Anschluss an die Ergebnisse zu den stabilen Aminen thematisiert.

Die Kalibriergeraden bzw. -kurven, die für die Quantifizierung der UPLC-MS/MS-Messdaten eingesetzt wurden, sind im Anhang A.4 zusammengestellt (Bild 83 bis Bild 100).

Bei den höchsten für den Methodenvergleich eingesetzten Konzentrationen (Bild 35; **zwischen 1,3 und 4,7 µg/L**) werden bei der UPLC-MS/MS-Analyse sowohl mit der Gradientenmethode als auch mit der isokratischen Methode alle 15 stabilen Amine in der erwarteten bzw. berechneten Konzentration gefunden. Geringe Abweichungen treten bei 2,4-TDA (A04), p-Kresidin (A08), 2-Naphthylamin (A13) und 4,4'-Thiodianilin (A19) auf. Die Differenzen befinden sich im Bereich der Messunsicherheit der jeweiligen Amine (vergleiche Ziffer 4.1.3 und Ziffer 4.1.4). Die Fehlerbalken sind i.d.R. klein, lediglich bei 2,4-TDA (A04), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) sind sie etwas größer. Die Resultate der beiden chromatographischen Methoden weichen kaum voneinander ab.

Die GC-MS-Analytik zeigt bei 5 stabilen Aminen [2,4,5-Trimethylanilin (A07), p-Kresidin (A08), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), o-Aminoazotoluol (A20) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)] eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Konzentrationen. Die Doppelbestimmung (ohne Kenntnis der Zuordnung!) ergibt gut übereinstimmende Ergebnisse.

Bei 3 stabilen Aminen [4-Chloranilin (A06), 2-Naphthylamin (A13) und 4-Aminobiphenyl (A14)] treten geringfügige, bei 2 Aminen [4,4'-Thiodianilin (A19), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21)] größere Minderbefunde auf. Die Doppelbestimmung ergibt gut übereinstimmende Ergebnisse.

Vier der 15 stabilen DIBt-Amine werden von der GC-MS-Analytik nicht gefunden [o-Toluidin (A01), 2,4-TDA (A04), 4,4'-MDA (A16) und 4,4'-Oxydianilin (A17)].

Die GC-MS-Analyse von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) ergibt in einer Probe einen geringen Minderbefund und in der zweiten Probe einen extremen Überbefund (> Faktor 3). Für Konzentrationen über 0,5 µg/L ist dies das einzige Beispiel für einen deutlichen Überbefund bzw. (bzgl. der Höhe der Konzentration) für ein falsch positives Analysenergebnis.

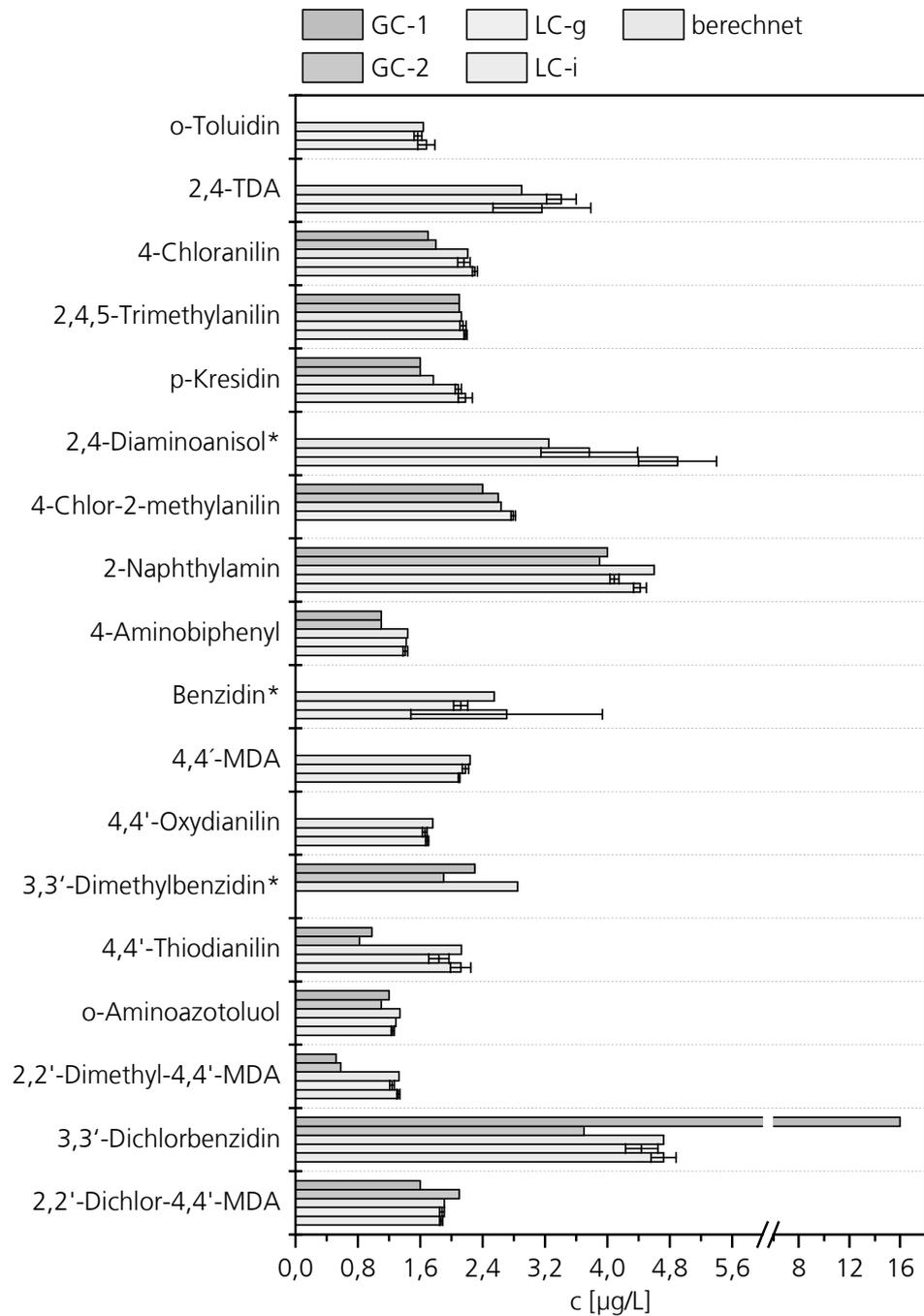


Bild 35: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der höchsten zudosierten Konzentration (1,3 bis 4,7 µg/L).

Das instabile Amin 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) wird in beiden Proben in der GC-MS-Analytik annähernd in der berechneten Konzentration nachgewiesen während die UPLC-MS/MS-Analyse dieses Amin nicht nachweisen konnte.

Die anderen beiden instabilen Amine [2,4-Diaminoanisol (A09) und Benzidin (A15)] werden von der UPLC-MS/MS-Analytik annähernd in der berechneten Konzentration gefunden (Überbefund bei A09 und Minderbefund bei A15), die GC-MS-Analytik hat diese Amine nicht nachgewiesen. Die Abweichungen zu den berechneten Werten sind in Anbetracht der schlechten Kalibrierung (Bild 88 bzw. Bild 95), der notwendigen quadratischen Regression (Bild 33 für A15) und insbesondere der Instabilität dieser Amine (Bild 28 bzw. Bild 30) akzeptabel.

Bei den zweithöchsten für den Methodenvergleich eingesetzten Konzentrationen (Bild 36; **zwischen 0,9 und 2,6 µg/L**) werden bei der UPLC-MS/MS-Analyse sowohl mit der Gradientenmethode als auch mit der isokratischen Methode 14 stabile Amine in der erwarteten bzw. berechneten Konzentration gefunden. Geringe bis sehr geringe Minderbefunde treten bei 2,4-TDA (A04), 2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), o-Aminoazotoluol (A20) auf. Bei 3,3-Dichlorbenzidin (A22) tritt nur bei der Gradientenmethode ein Minderbefund auf. Geringe Überbefunde treten bei p-Kresidin (A08) und bei 4-Chlor-2-methylanilin (A11) auf. Die Resultate der beiden chromatographischen Methoden weichen für mehrere Amine etwas deutlicher voneinander ab. Welche der beiden Methoden die genaueren Ergebnisse liefert, ist aus den Resultaten nicht direkt ersichtlich.

Die GC-MS-Analytik zeigt bei 5 stabilen Aminen [4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), p-Kresidin (A08), o-Aminoazotoluol (A20) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)] eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Konzentrationen. Die Doppelbestimmung ergibt gut übereinstimmende Ergebnisse. Bei 4-Chlor-2-methylanilin (A11) wird in einer der beiden Proben eine geringfügig zu hohe Konzentration gefunden.

Bei 2 stabilen Aminen [2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)] treten geringe, bei 2 Aminen [2-Naphthylamin (A13) und 4-Aminobiphenyl (A14)] größere Minderbefunde auf. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Proben nimmt ab.

Drei der 15 stabilen DIBt-Amine werden nicht gefunden [o-Toluidin (A01), 2,4-TDA (A04) und 4,4'-Oxydianilin (A17)], bei zwei weiteren Aminen [4,4'-MDA (A16) und 4,4'-Thiodianilin (A19)] wird nur in je einer der beiden Proben eine wesentlich zu niedrige Konzentration nachgewiesen.

Das instabile Amin 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) wird in beiden Proben in der GC-MS-Analytik nachgewiesen, jedoch als deutlicher Minderbefund. Die UPLC-MS/MS-Analyse konnte dieses Amin wieder nicht nachweisen.

2,4-Diaminoanisol (A09) wird nur von der UPLC-MS/MS-Analytik gefunden (Überbefund).

Benzidin (A15) wurde ausschließlich mit der UPLC-MS/MS-Analytik und nur mit der isokratischen Methode nachgewiesen.

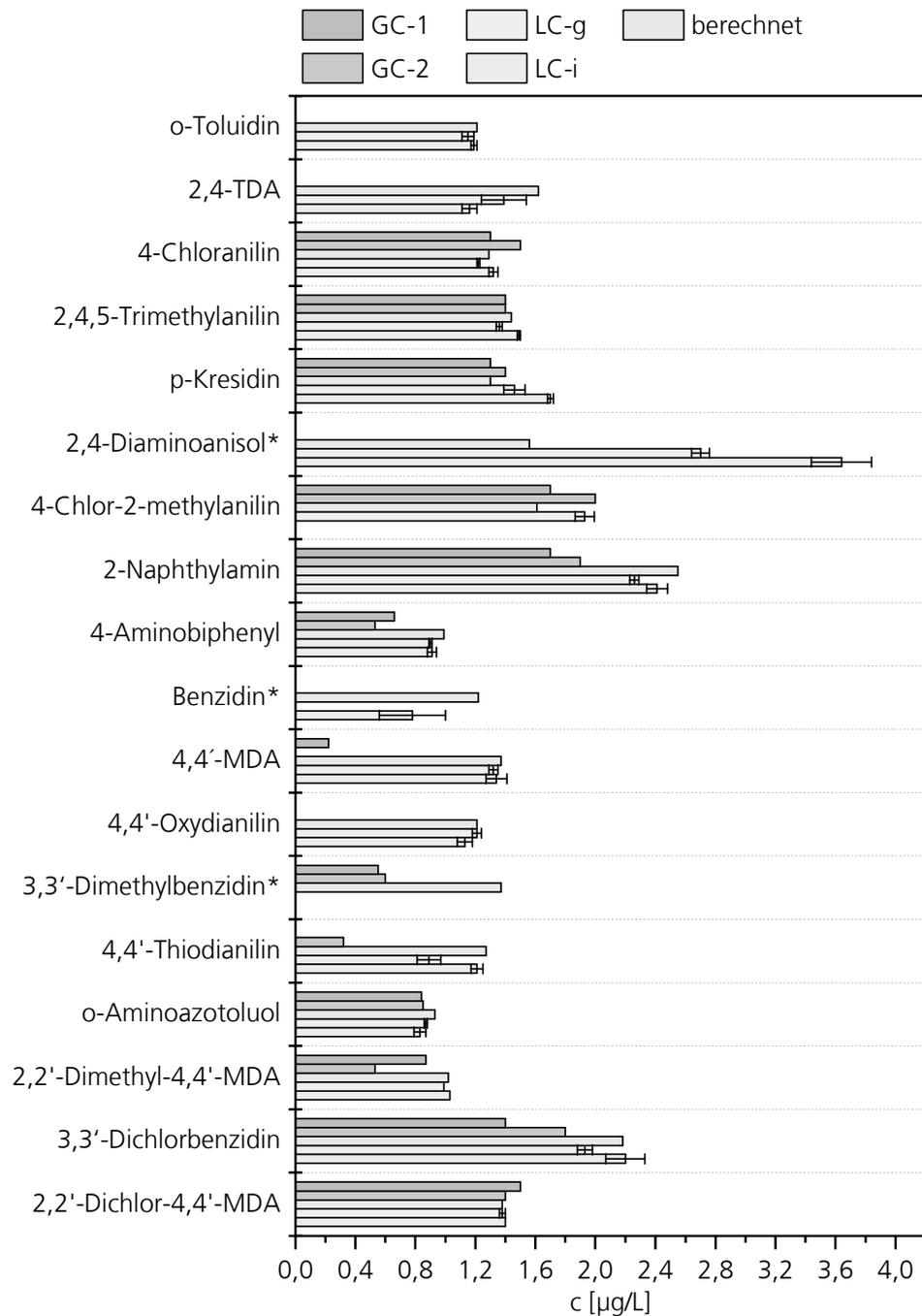


Bild 36: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der zweithöchsten zudosierten Konzentration (0,9 bis 2,6 µg/L).

Bei den zweitniedrigsten für den Methodenvergleich eingesetzten Konzentrationen (Bild 37; **zwischen 0,4 und 1,2 µg/L**) werden bei der UPLC-MS/MS-Analyse sowohl mit der Gradientenmethode als auch mit der isokratischen Methode 7 stabile Amine in der erwarteten bzw. berechneten Konzentration gefunden [4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), 4-Aminobiphenyl (A14), 4,4'-MDA (A16), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)]. Sehr geringe Minderbefunde treten bei 4 Aminen auf [o-Toluidin (A01), 2-Naphthylamin (A13), 4,4'-Oxydianilin (A17) und o-Aminoazotoluol (A20)], geringe bei 4,4'-Thiodianilin (A19). Bei 2,4-TDA (A04), p-Kresidin (A08) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) wurden mit beiden chromatographischen Methoden deutliche Überbefunde erhalten. Die Resultate der beiden chromatographischen Methoden weichen kaum voneinander ab. Die Fehlerbalken sind klein, die Wiederholbarkeit ist gut.

Die GC-MS-Analytik zeigt bei 2 stabilen Aminen [4-Chlor-2-methylanilin (A11) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)] eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Konzentrationen.

Die Doppelbestimmung ergibt – mit Ausnahme von 4,4-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) – gut übereinstimmende Ergebnisse. Überbefunde kommen (bis auf 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA in einer der beiden Proben) nicht vor.

Bei 5 stabilen Aminen [4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), p-Kresidin (A08), o-Aminoazotoluol (A20) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)] treten geringe, bei 2 Aminen [2-Naphthylamin (A13) und 4-Aminobiphenyl (A14)] größere Minderbefunde auf.

Sechs der 15 stabilen DIBt-Amine werden nicht oder nur in einer der beiden Proben in viel zu geringer Konzentration gefunden [o-Toluidin (A01), 2,4-TDA (A04), 4,4'-MDA (A16), 4,4'-Oxydianilin (A17), 4,4-Thiodianilin (A19) und 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21)]

Das instabile 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) wird in der GC-MS-Analytik in einer der beiden Proben nachgewiesen, jedoch als deutlicher Minderbefund. Die UPLC-MS/MS-Analyse konnte dieses Amin wieder nicht nachweisen.

2,4-Diaminoanisol (A09) und Benzidin (A15) werden nur von der UPLC-MS/MS-Analytik mit der isokratischen Methode gefunden (Minderbefunde).

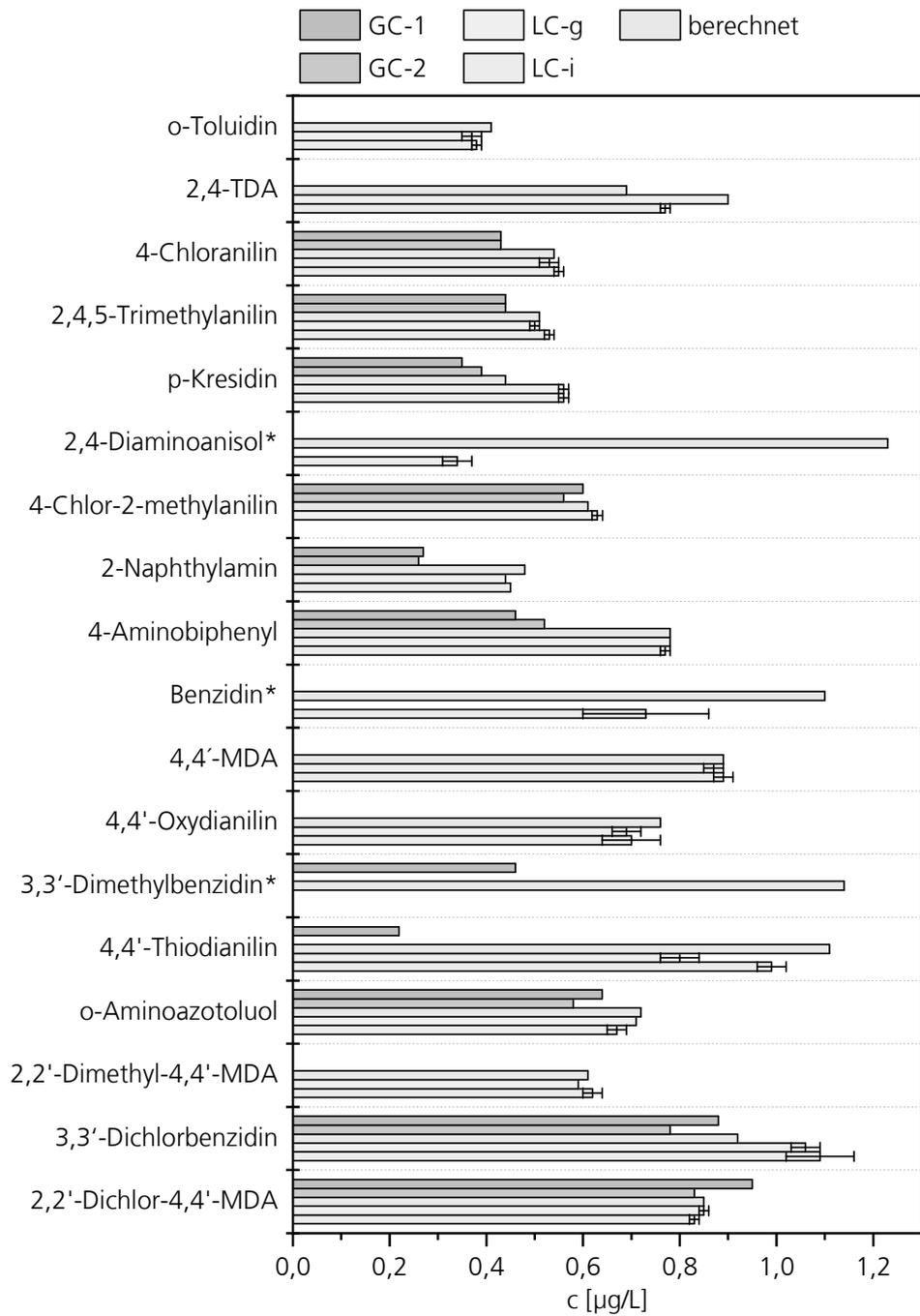


Bild 37:  
 Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der zweitkleinsten zudosierten Konzentration (0,4 bis 1,2 µg/L).

Bei den niedrigsten für den Methodenvergleich eingesetzten Konzentrationen (Bild 38; **zwischen 0,1 und 0,3 µg/L**) tritt bei der UPLC-MS/MS-Analyse nur bei einem stabilen Amin, bei o-Toluidin (A01), ein (geringfügiger) Minderbefund auf, alle weiteren 14 stabilen Amine werden entweder in der erwarteten Konzentration gefunden oder es treten Überbefunde auf. Die Fehlerbalken sind bei allen Aminen klein, die Wiederholbarkeit ist gut. Mit der Gradientenmethode werden 11 stabile Amine annähernd in der erwarteten bzw. berechneten Konzentration gefunden [o-Toluidin (A01), 4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), 2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), 4,4'-MDA (A16), 4,4'-Oxydianilin (A17), o-Aminoazotoluol (A20), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)]. Mit der isokratischen Methode werden 3 weitere stabile Amine in der berechneten Konzentration gefunden [p-Kresidin (A08), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)]. Mit der isokratischen Methode weicht nur ein einziges Amin um mehr als 0,05 µg/L von der berechneten Konzentration ab: 2,4-TDA (A04).

Mit der Gradientenmethode wurden bei 4 der 15 stabilen Amine teilweise deutliche Überbefunde erhalten [2,4-TDA (A04), p-Kresidin (A08), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)], mit der isokratischen Methode lediglich bei 2,4-TDA (A04). [Mit einer äquidistanten Kalibrierung im interessierenden Konzentrationsbereich, ggf. mit einer quadratischen Regression, sowie durch die Verwendung eines höheren Acetonitrilanteils (35 % statt 7 % im Vial) auch bei der Gradientenmethode zur Reduzierung von Adsorptionseffekten, s. Ziffer 4.1.3 und Anhang A.8, kann die Quantifizierung verbessert werden.]

Die GC-MS-Analytik zeigt nur noch bei 4-Chlor-2-methylanilin (A11) eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Konzentrationen (geringer Minderbefund). 2-Naphthylamin (A13) wird nur in einer der beiden Proben (annähernd in der berechneten Konzentration) nachgewiesen. Alle weiteren 13 stabilen Amine sowie die 3 instabilen Amine werden nicht gefunden.

Das instabile Amin 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) konnte mit der UPLC-MS/MS-Analytik wieder nicht nachweisen werden.

2,4-Diaminoanisol (A09) wird in der UPLC-MS/MS-Analytik mit beiden chromatographischen Methoden in viel zu hoher Konzentration detektiert.

Bei Benzidin (A15) werden mit der isokratischen Methode in beiden Proben Minderbefunde erhalten (gute Wiederholbarkeit, extrem kleiner Fehlerbalken). Mit der Gradientenmethode wurde nur in einer der beiden Proben (schraffierter, cyanfarbener Balken) Benzidin detektiert, jedoch in einer viel zu hohen Konzentration (falsch positiver Befund).

Während die GC-MS-Methode tendenziell bessere Resultate ergibt, je höher die Konzentration an Amin ist, stimmen die Ergebnisse der UPLC-MS/MS-Analyse auch bei den geringeren der untersuchten Konzentrationen gut mit den berechneten, erwarteten Konzentrationen überein.

Ein wichtiges Gesamtergebnis des Methodenvergleichs ist, dass die GC-MS-Analytik bei geringen Konzentrationen für alle DIBt-Amine außer 4-Chlor-2-methylanilin (A11) „blind“ ist. 4,4'-MDA wurde auch in höheren Konzentrationen (2,24 µg/L und 1,37 µg/L) bei der Analyse mittels GC-MS nicht gefunden.

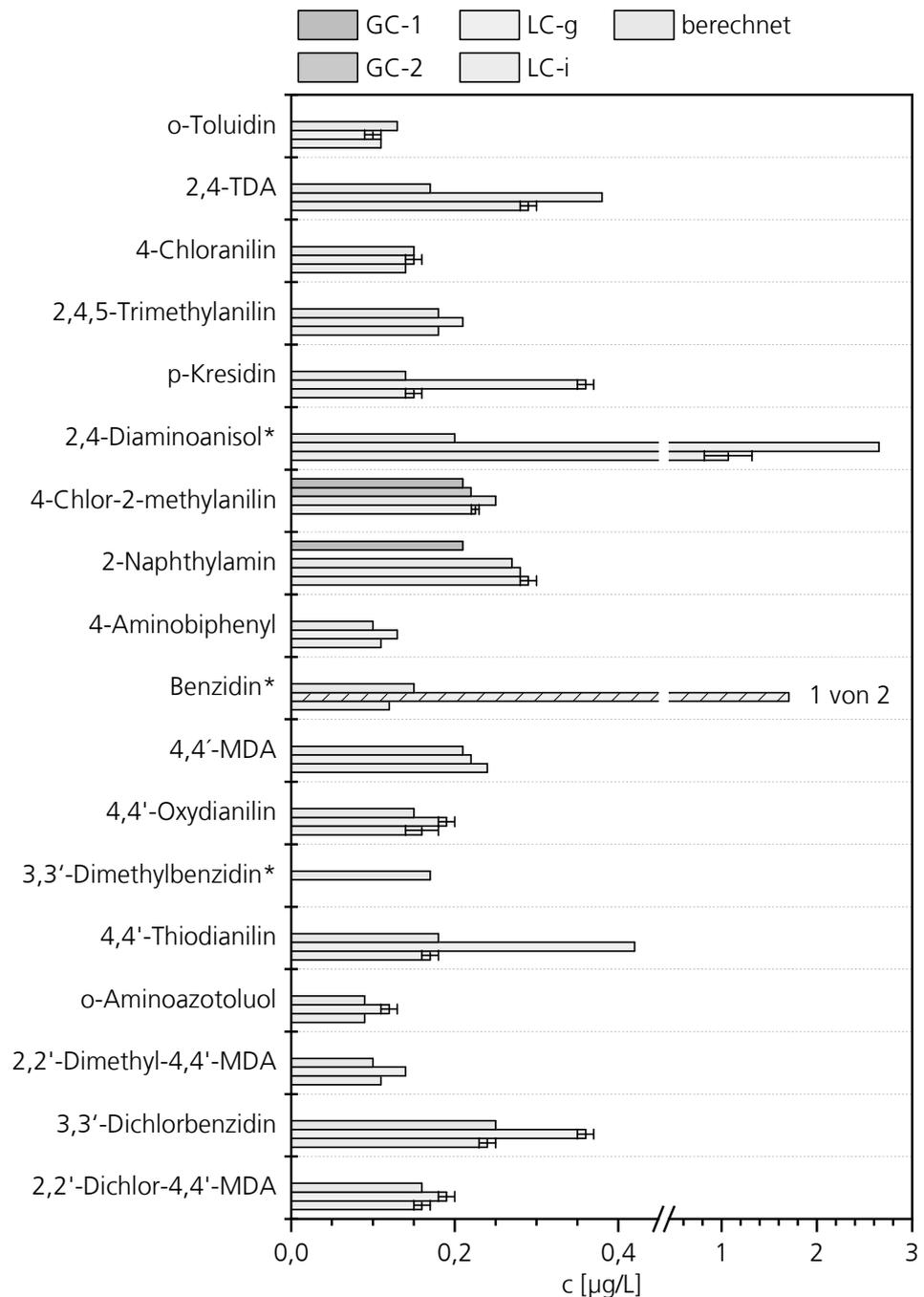


Bild 38:  
Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der kleinsten zudosierten Konzentration (0,1 bis 0,3 µg/L).

## 4.2.2 Amine in ISV-Eluaten

Um den Einfluss von im ISV-Eluat vorkommenden Matrixbestandteilen auf das Analyseergebnis zu untersuchen, wurde Mischung D (s. Bild 4 auf S. 21) zu zwei ISV-Eluaten zudosiert (s. Ziffer 3.3). Beim Eluat von Harz B (grüne Balken) wird ein geringer, beim Harz A (rote Balken) ein großer Matrixeffekt erwartet, siehe Bild 39 bis Bild 41. Zum Vergleich sind auch die Resultate der Proben gezeigt (blaue Balken), bei denen die Mischung D in Reinstwasser zudosiert wurde. Für jede Probenart sind beide Proben dargestellt (jeweils heller und dunkler Balken). Die nach Aminen sortierten Ergebnisse sind im Anhang A.5 in Bild 101 bis Bild 118 dargestellt.

In Bild 39 bis Bild 41 sind die Resultate nach Analysenmethode getrennt dargestellt. Bild 39 zeigt die Ergebnisse der UPLC-MS/MS-Analytik mit der Gradientenmethode (LC-g-Analytik). In Bild 40 sind die Ergebnisse der UPLC-MS/MS-Analytik mit der isokratischen Methode (LC-i-Analytik) aufgeführt. Bei der isokratischen Methode sind die beiden Chlor-2-methylisomere A10 (3-Isomer) und A11 (4-Isomer) aufgrund der mangelnden chromatographischen Isomerentrennung zusammengefasst (sowohl bei der berechneten Konzentration als auch bei der Kalibrierung). Die Resultate der GC-MS-Analyse (GC-Analytik) sind in Bild 41 dargestellt.

Bei der **LC-g-Analytik** (Bild 39) entspricht bei 6 Aminen die gemessenen Konzentrationen in allen sechs Proben (je 2x Reinstwasser, Eluat Harz B und Eluat Harz A) den berechneten bzw. erwarteten Konzentrationen [4-Chloranilin (A06), p-Kresidin (A08), 4,4'-Oxydianilin (A17), o-Aminoazotoluol (A20), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)]. Bei 4-Chloranilin (A06) (beide Harze) sowie bei 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) bei Harz A ist evtl. ein geringer Suppressionseffekt vorhanden.

Im Eluat von Harz B weisen in der LC-g-Analytik (Bild 39) 8 weitere Amine keine oder nur geringe Abweichungen (i.d.R. Minderbefunde) zur berechneten Konzentration bzw. zur ermittelten Konzentration in den Reinstwasserproben auf [2,4-TDA (A04), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), 2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), 4,4'-MDA (A16), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)]. Deutliche Minderbefunde im Eluat von Harz B gibt es nur bei o-Toluidin (A01) (bei guter Wiederholbarkeit).

In allen vier LC-g-Harz-Eluat-Proben (Harz A und Harz B; 7 % Acetonitrilanteil im Vial) treten bei den drei instabilen Aminen 2,4-Diaminoanisol (A09), Benzidin (A15) und 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) Überbefunde auf. Die Überbefunde können darauf hindeuten, dass diese Amine bereits im Eluat des Harzes B vorhanden waren, die große Analysenunsicherheit bei diesen drei Aminen lässt jedoch keine eindeutige Einschätzung zu. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen ist, dass weitere Komponenten im Eluat mit dem gelösten Sauerstoff abreagieren und auf diese Weise während der Analysensequenz ein geringerer Anteil an Analyt abgebaut wird als in den Kalibrierlösungen. Die Ursache ist dann in den geringeren tatsächlichen Konzentrationen in den Kalibrierlösungen

zu finden (x-Achsen-Fehler), die bei Anwendung dieser Kalibration in den Eluatproben zu scheinbar erhöhten Konzentrationen führen. (Für diese Erklärung spricht die für diese Amine sehr gute Wiederholbarkeit bzw. die geringe Abweichung zwischen den Harz-Eluat-Proben.) Das Problem kann gelöst werden, indem das Standardadditionsverfahren genutzt wird: Zum Vorteil der Berücksichtigung von Matrixeffekten kommt somit noch der Vorteil einer Stabilisierung der instabilen Amine.

Im Eluat von Harz A weist 2,4-TDA (A04) in der LC-g-Analytik (Bild 39) geringe Minderbefunde auf. Eindeutige Minderbefunde im Eluat von Harz A gibt es bei 7 Aminen [o-Toluidin (A01), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), 2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)]. Die deutlichen Minderbefunde (z.B. bei 2,4,5-Trimethylanilin) zeigen die Notwendigkeit einer Berücksichtigung von Matrixeffekten durch die Anwendung des Standardadditionsverfahrens.

Die sehr hohe Konzentration von 4,4'-MDA (A16) im Eluat von Harz A ist auf die Konzentration an 4,4'-MDA im Eluat vor der Zudosierung zurückzuführen.

Bei der **LC-i-Analytik** (Bild 40) entspricht nur bei 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) die gemessene Konzentration in allen Proben (je 2x Reinstwasser, Eluat Harz B und Eluat Harz A) der berechneten bzw. erwarteten Konzentration.

Im Eluat von Harz B weisen in der LC-i-Analytik (Bild 40) 2 weitere Amine keine oder nur sehr geringe Abweichungen (i.d.R. Minderbefunde) zur berechneten Konzentration bzw. zur ermittelten Konzentration in den Reinstwasserproben auf [4,4'-MDA (A16) und o-Aminoazotoluol (A20)].

Eindeutige Minderbefunde in den Eluaten beider Harze gibt es bei 11 Aminen [o-Toluidin (A01), 2,4-TDA (A04), 4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), p-Kresidin (A08), 4-Chlor-2-methylanilin (A11), 2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), 4,4'-Oxydianilin (A17), 4,4'-Thiodianilin (A19) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)]. Der Minderbefund von o-Aminoazotoluol (A20) im Eluat von Harz A fällt gering aus.

Auch mit der LC-i-Analytik wurden sehr hohe Konzentration von 4,4'-MDA (A16) im Eluat von Harz A gemessen.

2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) wurde nur in den Reinstwasserproben gefunden (mit idealer Übereinstimmung zur berechneten Konzentration), nicht jedoch in den vier Harz-Eluat-Proben.

In Anbetracht der großen Messunsicherheit entsprechen die in den Harzproben ermittelten Konzentrationen von Benzidin (A15) weitgehend der berechneten Konzentration. Bei 2,4-Diaminoanisol (A09) treten in allen vier Harz-Eluat-Proben Minderbefunde auf. 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) wurde weder in den Reinstwasser- noch in den Harz-Eluat-Proben nachgewiesen.

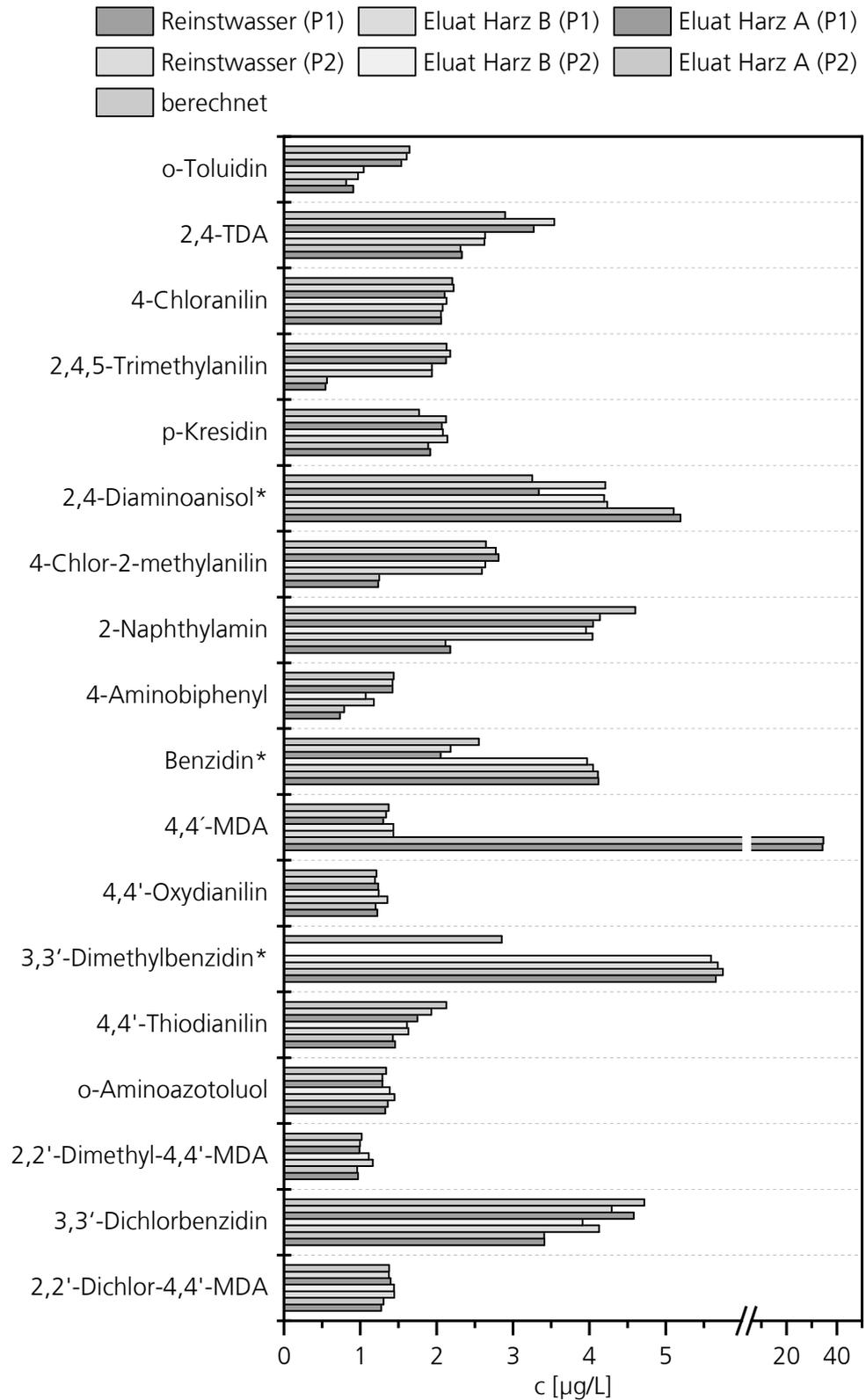


Bild 39:  
Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die LC-g-Ergebnisse.

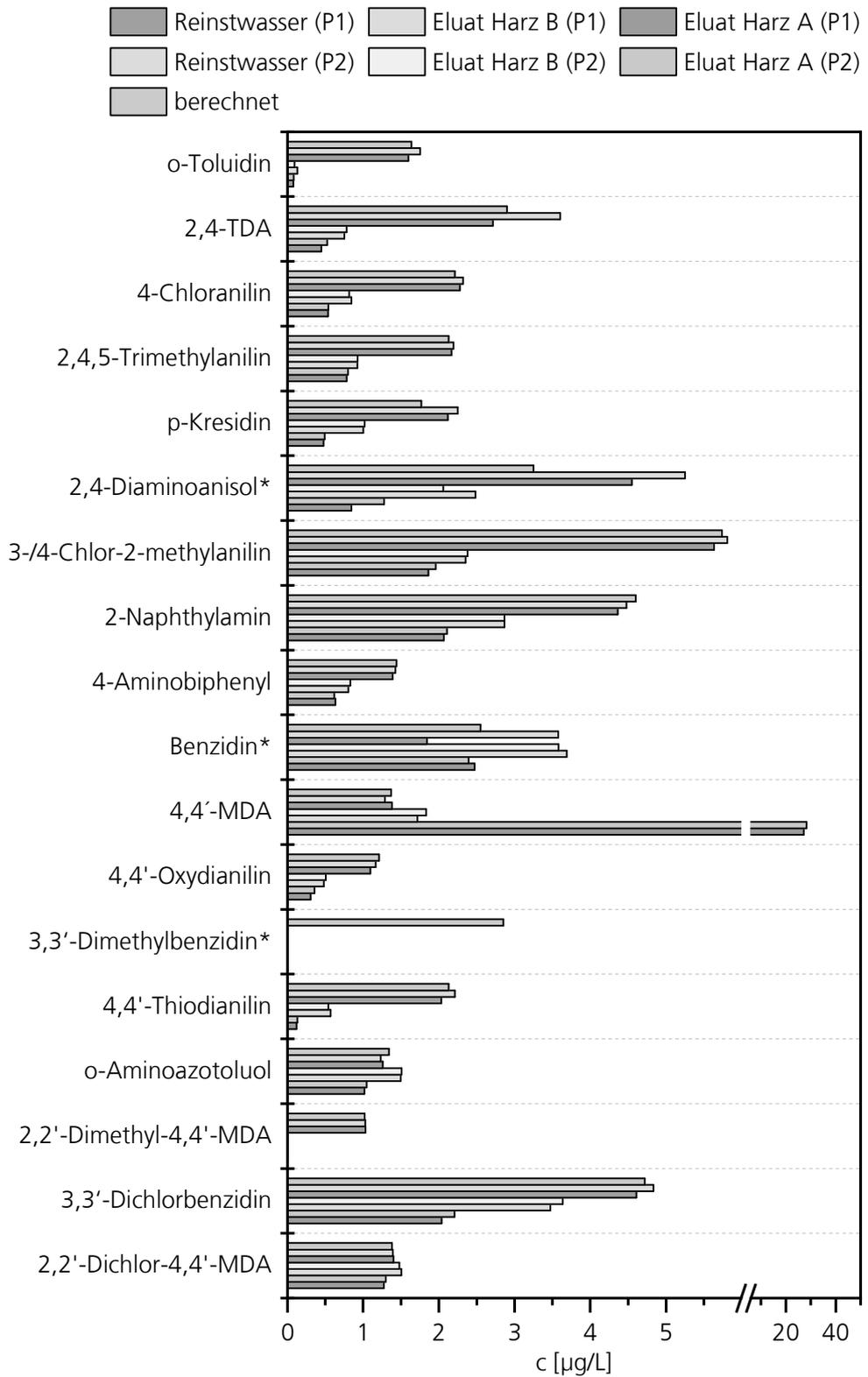


Bild 40:  
Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die LC-i-Ergebnisse.

Bei der **GC-Analytik** (Bild 41) entspricht bei keinem Amin die gemessene Konzentration in allen sechs Proben (je 2x Reinstwasser, Eluat Harz B und Eluat Harz A) der berechneten bzw. erwarteten Konzentration. Geringfügige Abweichungen treten bei 5 Aminen auf [4-Chloranilin (A06), 2,4,5-Trimethylanilin (A07), p-Kresidin (A08), 4-Chlor-2-methylanilin (A11) und o-Aminoazotoluol (A20)].

2,4-TDA (A04) wurde in keiner der sechs Proben (je 2x Reinstwasser, Eluat Harz B und Eluat Harz A) nachgewiesen. Ursache ist die sehr gute Wasserlöslichkeit dieses Amins, wodurch das Ausschütteln mit einem organischen Lösungsmittel aus der wässrigen Probe beeinträchtigt ist.

Im Eluat von Harz B weisen in der GC-Analytik (Bild 41) 2 weitere Amine geringe Abweichungen zur berechneten Konzentration auf [o-Toluidin (A01) und 3,3'-Dichlorbenzidin (A22)]. In Harz B-Eluat-Proben werden für 2 Amine [2-Naphthylamin (A13) und 4-Aminobiphenyl (A14)] geringe Minderbefunde und für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) geringe Überbefunde gefunden. Bei 4,4'-Oxydianilin (A17) und 4,4'-MDA (A16) wird jeweils nur in einer Probe jeweils eine zu geringe Konzentration gefunden. Bei 4,4'-Thiodianilin (A19) ist die Wiederholbarkeit schlecht, in einer Probe wird eine zu hohe und in der anderen Probe eine zu geringe Konzentration gefunden. 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) wird nur in einer der beiden Harz B-Eluat-Proben in einer etwas zu hohen Konzentration gefunden.

Im Eluat von Harz A treten bei 5 Aminen deutliche Minderbefunde auf [2-Naphthylamin (A13), 4-Aminobiphenyl (A14), 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21), 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23)]. Im Eluat von Harz A wurden 5 stabile Amine mit der GC-Analytik nicht nachgewiesen [o-Toluidin (A01), 2,4-TDA (A04), 4,4'-MDA (A16), 4,4'-Oxydianilin (A17) und 4,4'-Thiodianilin (A19)].

Die beiden instabilen Amine 2,4-Diaminoanisol (A09) und Benzidin (A15) werden in der GC-Analytik in keiner der vier Harz-Eluat-Proben gefunden. Bei 3,3'-Dimethylbenzidin (A18) treten sowohl in den Reinstwasserproben als auch in den Harz B-Eluat-Proben Minderbefunde auf, in den Harz A-Eluat-Proben wird 3,3'-Dimethylbenzidin nicht nachgewiesen.

Die Abweichung der Resultate zwischen der LC-Analytik (LC-g und LC-i) und der GC-Analytik ist bei 4,4'-MDA (A16) extrem. Während die LC-Analyse der Harz A-Eluat-Proben 4,4'-MDA-Konzentrationen über 25 µg/L ergibt, wird dieses Amin in der GC-Analytik in keiner der beiden Harz A-Eluat-Proben gefunden.

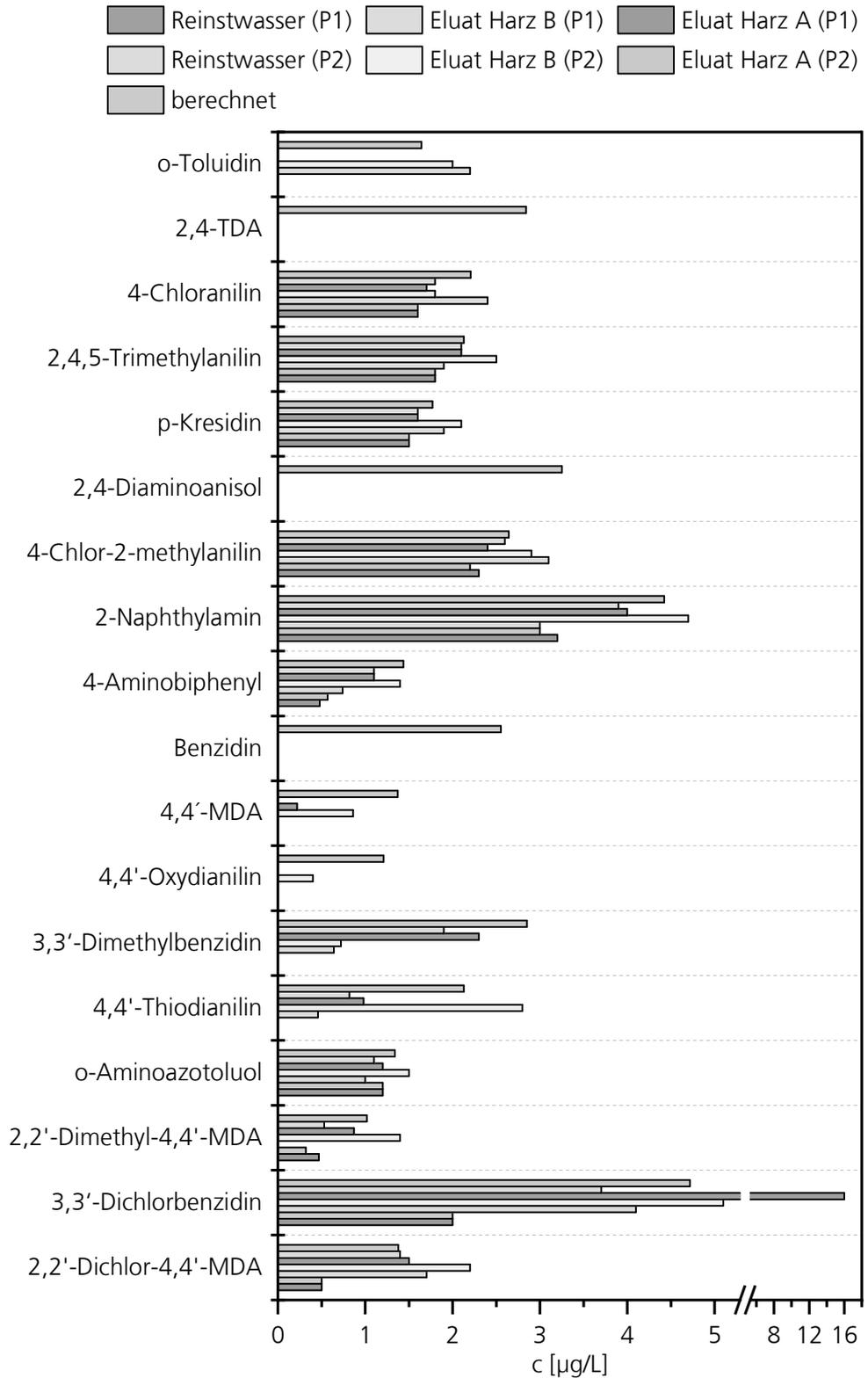


Bild 41:  
Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die GC-Ergebnisse.

### 4.3 Produktscreening und Zeitverlauf im ISV

#### 4.3.1 Eluate ohne Zusatz (Transport und Lagerung)

In den neutralen Eluatfraktionen (also ohne Säurezugabe) aus dem inversen Säulenversuch (ISV) (Ziffer 3.4) konnten drei DIBt-Amine nachgewiesen werden:

- bis zu 1 µg/L 4-Chloranilin (A06) entsprechend  
0,010 µg/L im Vortest und  
0,500 µg/L in der Spurenanalyse und im Matrixtest  
(kalibriert von 0,0085 bis 0,85 µg/L im Vial),
- bis zu 15 µg/L 4,4'-MDA (A16) entsprechend  
0,150 µg/L im Vortest und  
(7,5 µg/L in der Spurenanalyse und im Matrixtest; MDA ausgeblendet)  
(kalibriert von 0,0105 bis 1,05 µg/L im Vial) und
- bis zu 4,8 µg/L 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) entsprechend  
0,048 µg/L im Vortest und  
2,4 µg/L in der Spurenanalyse und im Matrixtest (> Kalibrierung)  
(kalibriert von 0,0079 bis 0,79 µg/L im Vial).

Die höchsten 4,4'-MDA-Konzentration werden in den Fraktionen 7 und 13 detektiert (Bild 42 und Bild 43). 4-Chloranilin (A06) und 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) weisen ebenfalls ein Maximum in Fraktion 7 auf.

In Bild 42 (sowie in Bild 44 bis Bild 48) ist auch der TOC-Gehalt in den Fraktionen dargestellt (orangefarbene Dreiecke). Der TOC-Gehalt weist zwei hohe Maxima (Fraktionen 4/5 und 10) und ein kleines lokales Maximum (Fraktion 7) zwischen den anderen beiden Maxima auf. Die TOC-Maxima werden als Orientierung für die Auswahl der Fraktionen für die Aminanalytik mittels GC-MS eingesetzt. Daher wurden die Fraktionen 4, 5, 10 und 11 (rote Pfeile in Bild 42 und in Bild 44 bis Bild 48) als Mischfraktion der GC-MS-Analytik zugeführt. Wie der Zeitverlauf der Aminfreisetzung in Bild 42 bis Bild 48 zeigt, befinden sich die höchsten Aminkonzentrationen in Fraktionen, die nicht für die GC-MS-Analyse verwendet wurden. Die Aminfreisetzung setzte bei diesem Produkt bzw. Injektionsharz (für jedes Maximum) jeweils um ein bis drei Fraktionen später ein, das entspricht bei einem Volumenstrom von 4 L/h und einem Fraktionsvolumen von 2 L einer Zeitdifferenz von 0,5 bis 1,5 h. Durch diese Zeitverschiebung der Amin- gegen die TOC-Freisetzung und die daraus folgende Auswahl der „falschen“ Fraktionen, können bei der Aminanalyse systematische Minderbefunde auftreten. In der GC-MS-Aminanalytik der Mischfraktion (4, 5, 10 und 11) zu diesem Injektionsharz wurden keine DIBt-Amine nachgewiesen.

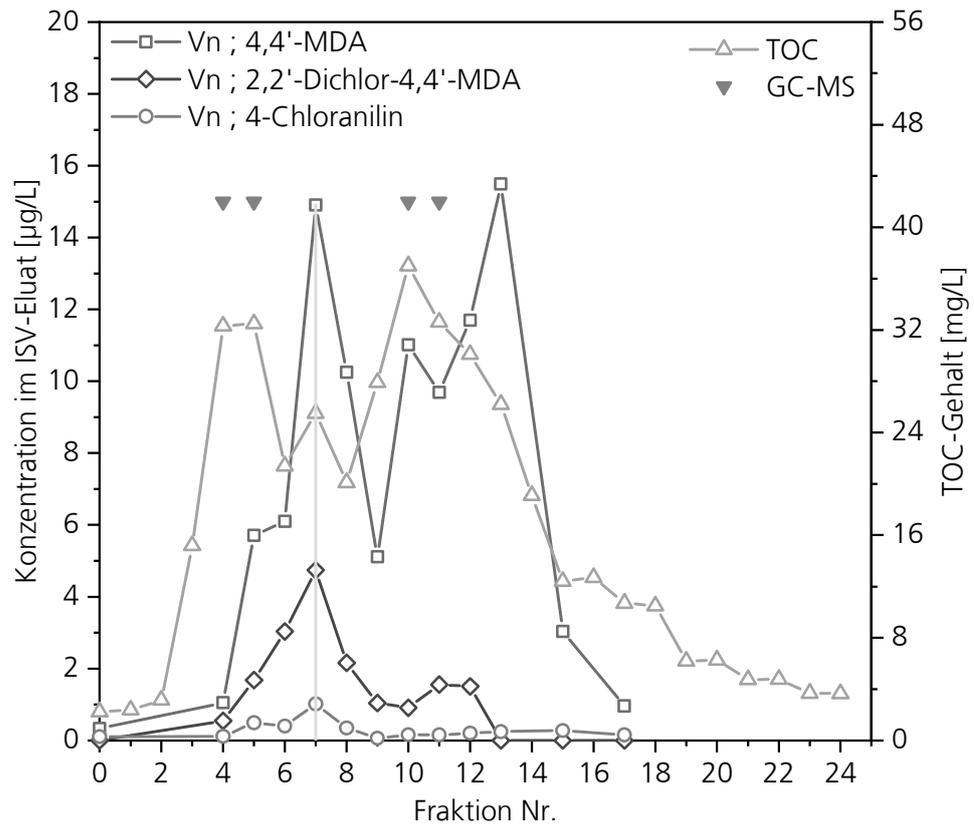


Bild 42:

TOC-Gehalt (total organic carbon) sowie Konzentrationen der drei nachgewiesenen DIBt-Amine 4,4'-MDA (A16), 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) und 4-Chloranilin (A06) in den Vortests mit den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die Eluate sind in den Vials um den Faktor 100 verdünnt. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

Im Vortest (V), also im 1:100-verdünnten Eluat, befinden sich die Konzentrationen an 4-Chloranilin im Bereich der Nachweisgrenze (NWG A06 V) und die Konzentrationen an 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA im Bereich der Bestimmungsgrenze (BG A23 V), siehe Bild 43. 4,4'-MDA tritt in den Fraktionen 5 bis 15 in Konzentrationen auf, die im Vortest ideal zu quantifizieren sind (Bestimmungsgrenze im Vortest = BG A16 V in Bild 43 = 1,3 µg/L im Eluat; Kalibrierung entspricht 1,05 bis 105 µg/L im Eluat).

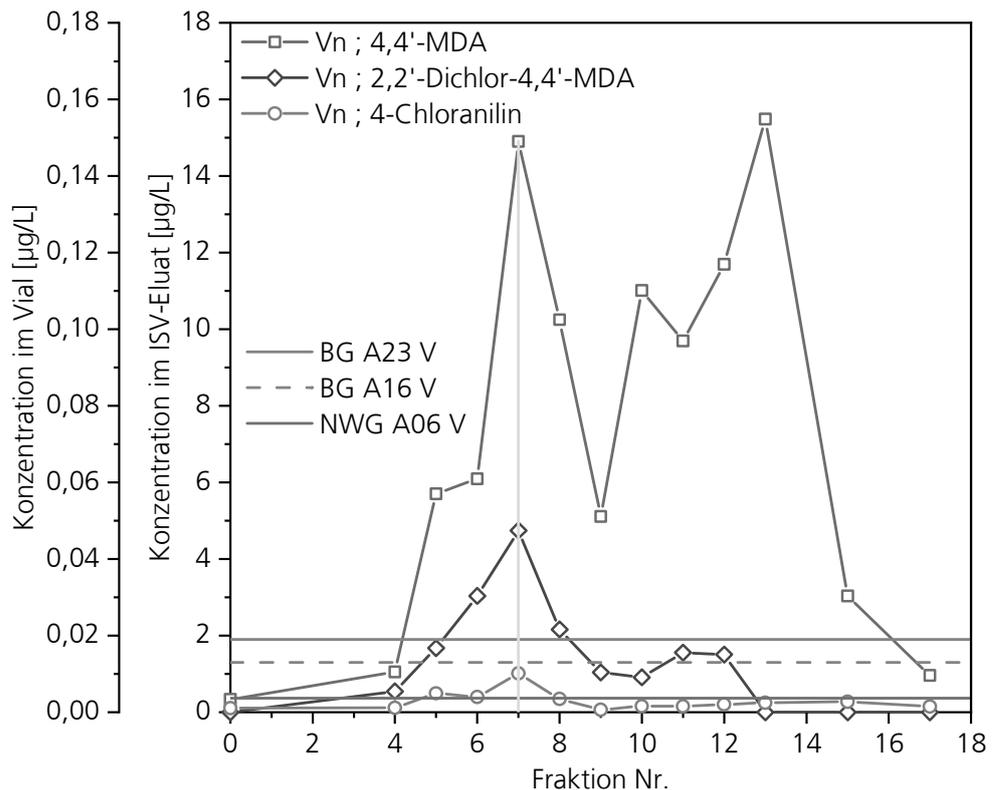


Bild 43:

Konzentrationen der drei nachgewiesenen DIBt-Amine 4,4'-MDA (A16), 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) und 4-Chloranilin (A06) in den Vortests mit den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die Eluate sind in den Vials um den Faktor 100 verdünnt.

In Bild 44 sind die Ergebnisse für 4-Chloranilin (A06) dargestellt. Die Konzentrationen in der Spurenanalyse (1:2-verdünnt) und im Matrixtest (1:2-verdünnt und Zusatz von 0,169 µg/L 4-Chloranilin im Vial bzw. 0,338 µg/L im Eluat) liegen im idealen Analysenbereich weit oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,024 µg/L (BG A06 MS). Die Konzentrationen im Vortest (1:100-verdünnt) liegen im Bereich der Nachweisgrenze (NWG A06 V) und unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG A06 V). Trotz der großen analytischen Unsicherheit der Werte aus dem Vortest zeigt der Vergleich mit der Spurenanalyse und dem Matrixtest eine prinzipielle Übereinstimmung des Zeitverlaufs mit einem ersten, hohen Maximum in Fraktion 7 und einem zweiten, niedrigeren und breiteren Maximum ab Fraktion 10. Die Konzentrationen des Matrixtests abzüglich der zudosierten 4-Chloranilin-Konzentration (0,338 µg/L; cyanfarbene Quadrate in Bild 44) ergibt eine sehr gute Übereinstimmung mit der ermittelten Konzentration in der Spurenanalyse (blaue Kreise in Bild 44). Eine Signalsuppression tritt demnach nicht auf.

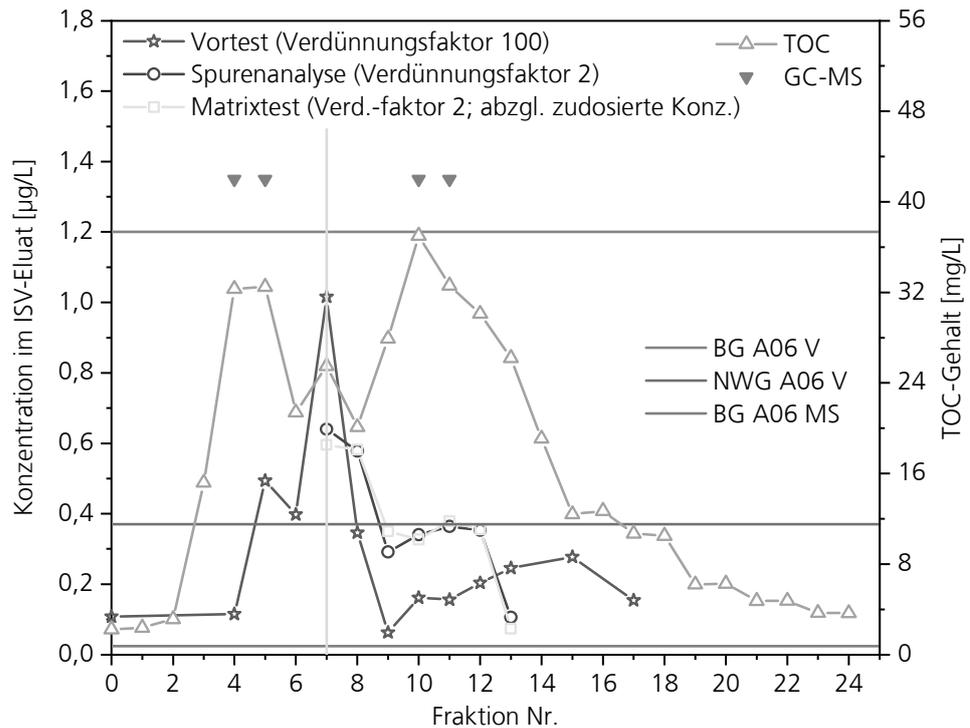


Bild 44:

Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. 1 µg/L im Eluat entspricht 0,5 µg/L in der Spurenanalyse sowie im Matrixtest und 0,01 µg/L im Vortest. Die im Matrixtest zudosierte Konzentration (0,338 µg/L im Eluat) ist rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

In Bild 45 sind die Ergebnisse für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) dargestellt. Die Konzentrationen in der Spurenanalyse (1:2-verdünnt) und im Matrixtest (1:2-verdünnt und Zusatz von 0,157 µg/L 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA im Vial bzw. 0,314 µg/L im Eluat) liegen weit oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,038 µg/L (BG A06 MS), jedoch auch oberhalb des kalibrierten Konzentrationsbereichs (von 0,016 bis 1,58 µg/L im Eluat). Die Konzentrationen im Vortest (1:100-verdünnt) liegen für die Fraktionen 6 bis 8 oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG A23 V) und für die Fraktionen 5 bis 12 oberhalb der Nachweisgrenze (NWG A23 V). Die Werte aus dem Vortest zeigen im Vergleich mit der Spurenanalyse und dem Matrixtest eine gute Übereinstimmung des Zeitverlaufs mit einem ersten, hohen Maximum in Fraktion 7 und einem zweiten, niedrigeren und breiteren Maximum in Fraktion 11. Die Konzentrationen des Matrixtests abzüglich der zudosierten 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA-Konzentration (0,314 µg/L; cyanfarbene Quadrate in Bild 45) ergibt eine gute Übereinstimmung mit der ermittelten Konzentration in der Spurenanalyse (blaue Kreise in Bild 45).

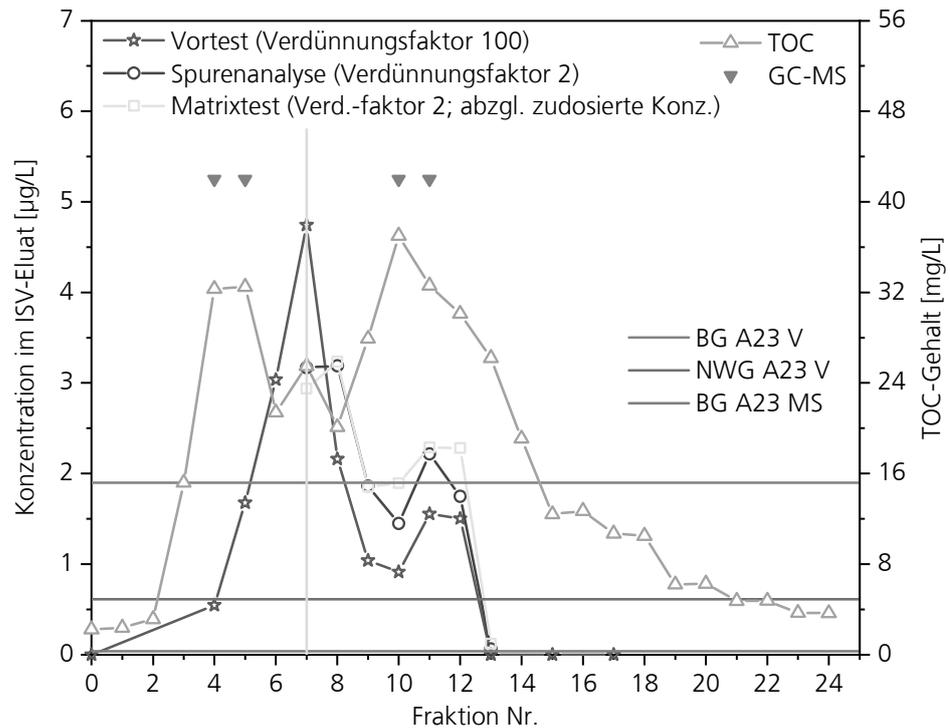


Bild 45:

Konzentrationen des DIBt-Amins 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) in den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. 1 µg/L im Eluat entspricht 0,5 µg/L in der Spurenanalyse sowie im Matrixtest und 0,01 µg/L im Vortest. Die im Matrixtest zudosierte Konzentration (0,314 µg/L im Eluat) ist rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

#### 4.3.2 Vergleich neutrale vs. angesäuerte Eluate (Transport und Lagerung)

In den für den Transport (& Lagerung) angesäuerten Eluaten (0,023 % Ameisensäure) aus dem inversen Säulenversuch (ISV) (Ziffer 3.4) konnten zwei DIBt-Amine nachgewiesen werden:

- 4-Chloranilin (A06) und
- 4,4'-MDA (A16).

Der Unterschied zu den neutralen Proben (Ziffer 4.3.1) lag ausschließlich in der Phase des Transports und der Lagerung. Sowohl beim inversen Säulenversuch als auch bei der UPLC-MS/MS-Analyse waren die Bedingungen identisch.

In Bild 46 bis Bild 48 sind die Ergebnisse der angesäuerten Fraktionsproben mit den Ergebnissen der Fraktionsproben ohne Säurezusatz vergleichend gegenübergestellt. Bild 46 zeigt den 4,4'-MDA-Konzentrationsverlauf (A16) im Vortest (1:100-verdünnt). In den angesäuerten Fraktionsproben sind die 4,4'-MDA-Konzentrationen grundsätzlich geringer als in den neutralen Fraktionsproben. Außerdem tritt nur ein breites Maximum mit der Spitze bei Fraktion 8 auf. Die Unterschiede in den Konzentrationsverläufen können nicht auf Unsicherheiten

der UPLC-MS/MS-Analyse zurückgeführt werden, denn der Konzentrationsbereich ist ideal für die Analytik und die Abweichungen sind zu groß. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Freisetzung aus (Mikro)Partikeln in den Eluatproben während des Transports und der Lagerung zu Abweichungen führt. Wahrscheinlicher ist, dass die Säure einen Einfluss auf die komplexe Zusammensetzung der Eluat- bzw. Matrixbestandteile hat bzw. Reaktionen katalysiert.

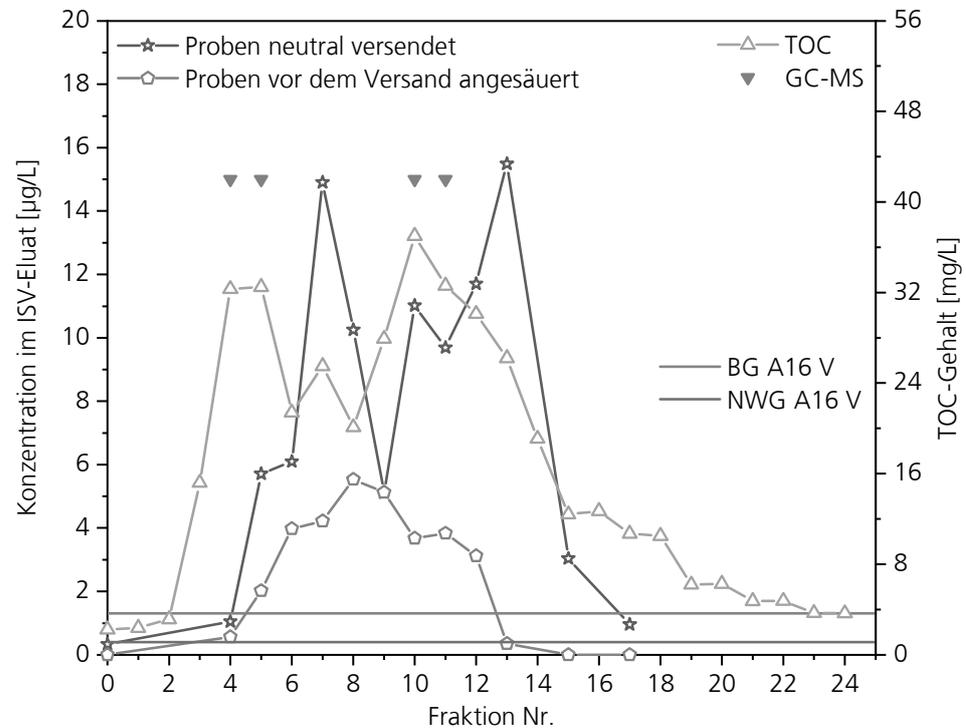


Bild 46: Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4,4'-MDA (A16) in den 1:100 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

Bild 47 zeigt den 4-Chloranilin-Konzentrationsverlauf (A06) im Vortest (1:100-verdünnt). Die in den Vials gemessenen Konzentrationen befinden sich im Bereich der Nachweisgrenze, daher sind die Analyseergebnisse mit einer großen Unsicherheit behaftet. Das erste Maximum bei Fraktion 7 tritt sowohl in den angesäuerten als auch in den neutralen Fraktionsproben auf. Die Konzentrationen sind in den angesäuerten Fraktionsproben 5 bis 8 geringer als in den entsprechenden neutralen Fraktionsproben. Die Fraktionsprobe 9 weist sowohl angesäuert als auch neutral ein Konzentrationsminimum auf. Nach dem Minimum ist bei den angesäuerten Fraktionsproben ein schmales, hohes Maximum und in den neutralen Fraktionsproben ein breites, flaches Maximum zu erkennen. Die gemessenen Konzentrationen in den angesäuerten Fraktionsproben 10 bis 12 sind höher als in den entsprechenden neutralen Fraktionsproben. In Anbetracht der Nähe zur Nachweisgrenze sind die Abweichungen nicht signifikant.

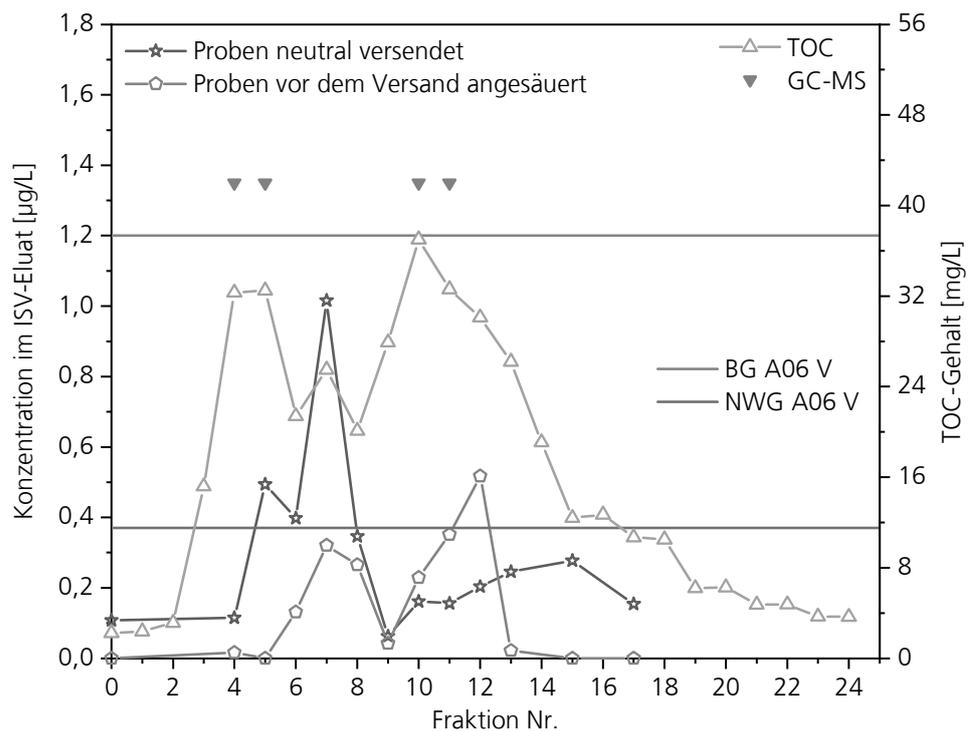


Bild 47:

Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den 1:100 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

Genauere Ergebnisse für den Vergleich der angesäuerten mit den neutralen Fraktionsproben bei 4-Chloranilin (A06) liefern die Spurenanalyse (1:2-verdünnt) und der Matrixtest (1:2-verdünnt und Zusatz von 0,169 µg/L 4-Chloranilin im Vial bzw. 0,338 µg/L im Eluat), siehe Bild 48. Die gemessenen Konzentrationen liegen im idealen Analysenbereich deutlich über der Bestimmungsgrenze (BG A06 MS) und noch im kalibrierten Bereich (0,017 bis 1,7 µg/L im Eluat). Die Beobachtung, dass in den angesäuerten Fraktionsproben beim zweiten Maximum, nach dem Minimum in Fraktion 9, die Konzentrationen höher liegen als bei den neutralen Fraktionsproben und beim ersten Maximum, vor dem Minimum in Fraktion 9, niedriger liegen als bei den neutralen Fraktionsproben, wird durch die Spurenanalysen- und Matrixtest-Ergebnisse bestätigt. Das Ansäuern (0,023% Ameisensäure) für den Transport und die Lagerung hat auch beim 4-Chloranilin einen Einfluss auf die Messergebnisse, wenn auch einen wesentlich geringeren als bei 4,4'-MDA.

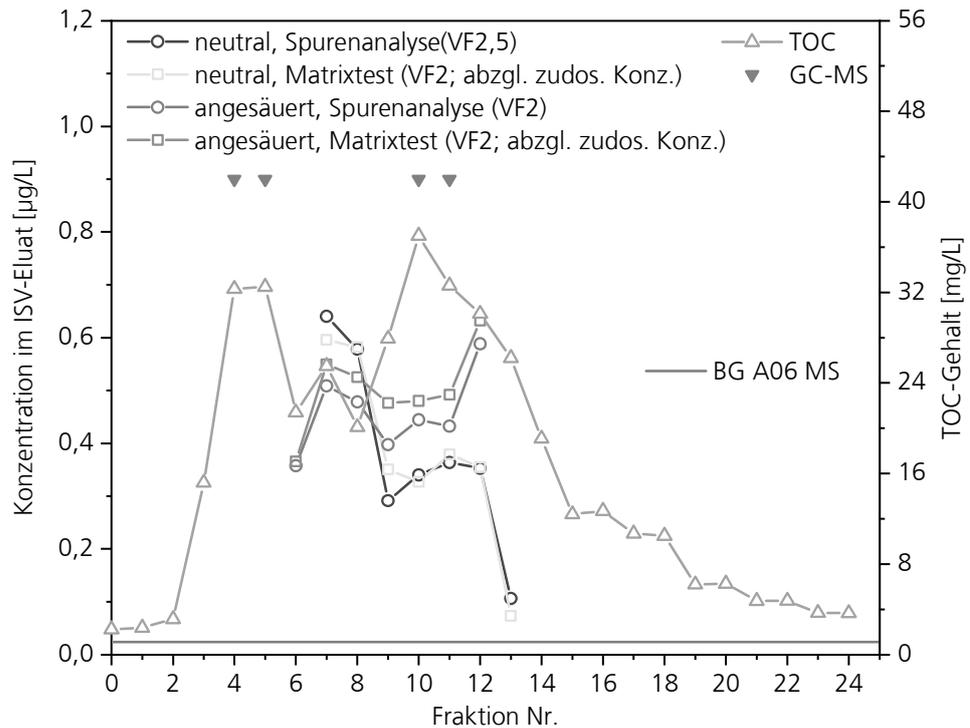


Bild 48:

Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den 1:2 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die in den Matrixtests zudosierten Konzentrationen (je 0,338 µg/L im Eluat) sind rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.

Der wesentlichste Unterschied zwischen den angesäuerten und den neutralen Fraktionsproben ist, dass 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) nur in den neutralen Proben, nicht jedoch in den angesäuerten Proben gefunden wurde (NWG im Eluat bei Spurenanalyse und Matrixtest: 0,012 µg/L; NWG im Eluat bei Vortest: 0,61 µg/L). [Beim Matrixtest mit den angesäuerten Fraktionsproben wurden in allen Fraktionen zwischen 0,38 und 0,41 µg/L 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA detektiert, diese Konzentration liegt um  $0,087 \pm 0,011$  µg/L konstant über dem erwarteten Wert von 0,314 µg/L. Die Spurenanalyse bei den angesäuerten Fraktionsproben ergab Konzentrationen zwischen 0,011 und 0,042 µg/L im Eluat. Im Zusammenhang mit den hohen Konzentrationen in den neutralen Fraktionsproben können diese Befunde mit einer Verschleppung während der Analysensequenz erklärt werden.]

Ergänzung:

In der zweiten Projektphase [9] wurden Injektionsharz-ISV-Eluat-Fraktionsproben zwischen inversem Säulenversuch und UPLC-MS/MS-Analyse für wenige Stunden sowohl angesäuert als auch neutral gelagert. Die vergleichenden Ergebnisse für 4,4'-MDA (und 2,4'-MDA) sind in Bild 119 im Anhang A.5 gezeigt. Auch bei diesem Versuch liegen die Konzentrationen in den angesäuerten Fraktionsproben niedriger als in den neutralen Fraktionsproben.

## 5 Ergebniszusammenfassung

Von den 18 aromatischen Aminen aus der DIBt-Liste können 15 Amine in Proben mit einer Nachweisgrenze unter 0,015 µg/L und einer Bestimmungsgrenze unter 0,049 µg/L analysiert werden (Ziffer 4.1.3). Bei zwei Aminen (Benzidin und 3,3'-Dimethylbenzidin) werden in Proben Bestimmungsgrenzen von etwa 2 µg/L erreicht (Ziffer 4.1.5). Ein instabiles Amin (2,4-Diaminoanisol) kann mit dem beschriebenen Analysenverfahren nicht zuverlässig bestimmt werden (Ziffer 4.1.5). Weitere Verfahrensverbesserungen sind möglich, jedoch aufwändig.

Der Methodenvergleich (Ziffer 4.2) hat aufgezeigt, dass die GC-MS-Analytik bei Konzentrationen unter 1 µg/L sehr häufig und unter 0,5 µg/L nahezu immer falsch negative Ergebnisse liefert. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 0,5 µg/L ist die UPLC-MS/MS-Analytik der GC-MS-Analytik deutlich überlegen.

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der Aminfreisetzung im Vergleich zum TOC-Verlauf (Ziffer 4.3.1) hat ergeben, dass TOC-Maxima und Aminmaxima zwar korrelieren, die Aminmaxima jedoch zeitlich (beim untersuchten Produkt um etwa 1,5 h) nach hinten verschoben sein können. Eine Auswahl von Fraktionen für die Aminanalytik anhand des TOC-Gehaltes kann zu Minderbefunden führen.

Das Ansäuern von Eluaten zur Stabilisierung der Amine hat sich nicht bewährt (Ziffer 4.3.2). Zum einen ist der Einfluss der Säure (0,02 bis 0,05 Vol.-%) auf die chemischen Prozesse und die Zusammensetzung im Eluat nicht ausreichend verstanden, zum anderen ist der Aufwand für das Ansäuern der Proben während der Durchführung des inversen Säulenversuches nicht unerheblich.

Der Methodenvergleich ergab, dass mit der isokratischen Methode in Eluatproben nicht weniger Minderbefunde erhalten werden als mit der Gradientenmethode (Ziffer 4.2.2). Die isokratische Methode hat zwar gegenüber der Gradientenmethode auch Vorteile, der Aufwand einer Analyse mit beiden chromatographischen Methoden steht jedoch in keinem Verhältnis zum Nutzen. Hinzu kommt die Fehleranfälligkeit durch Verwechslungen.

Die Minderbefunde in den ISV-Eluaten beim Methodenvergleich (Ziffer 4.2.2) haben (für alle drei untersuchten Methoden) die Notwendigkeit für die routinemäßige Anwendung des Standardadditionsverfahrens, bei dem den Probelösungen mehrere definierte Konzentrationen im interessierenden Konzentrationsbereich zudosiert werden, bestätigt. Durch das Standardadditionsverfahren werden zudem die analytischen Unsicherheiten durch die Änderung der Detektionsempfindlichkeit während der gerätetechnischen Stabilisierungsphase (Ziffer 4.1.4) verringert.

## 6 Ausblick

Mit dem bereitgestellten, im Bericht sowie in Anhang A.8 beschriebenen Analyseverfahren steht ein für die Routine geeignetes Verfahren zur Verfügung, das zur analytischen Quantifizierung als Grundlage für die Bewertung im Rahmen der allgemeinen Bauaufsichtlichen Zulassung eingesetzt werden kann.

Um grundsätzlich einschätzen zu können

- welche Amine in den ISV-Eluaten häufig vorkommen und
- in welchen Fraktionen des inversen Säulenversuchs diese Amine gefunden werden

wäre die Untersuchung einer größeren Anzahl an verschiedenen Injektionsharz-Produkten sowie bei mehreren Produkten ein Vergleich der Aminfreisetzung mit dem TOC-Verlauf in den Fraktionen nötig gewesen.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens war geplant, die ISV-Eluate von bis zu 15 Injektionsharzen auf die 18 DIBt-Amine zu untersuchen. Bei bis zu 10 Produkten sollte der Zeitverlauf der Aminfreisetzung im Vergleich zum TOC-Verlauf detailliert untersucht werden. Da im Verlauf des Forschungsvorhabens lediglich Eluatfraktionen eines einzigen Produktes zur Verfügung standen, konnten keine Aussagen über die Häufigkeit des Auftretens der kanzerogenen, aromatischen DIBt-Amine und ihr übliches zeitliches Freisetzungsverhalten getroffen werden.

Es wird daher vorgeschlagen, zukünftig routinemäßig ISV-Eluatfraktionen (je inverser Säulenversuch 16 Fraktionen) mittels UPLC-MS/MS-Analytik auf die Freisetzung der 18 DIBt-Amine (ggf. ohne 2,4-Diaminoanisol) zu untersuchen.

Dabei kann das Verfahren in einer Variante eingesetzt werden (Anhang A.8), die gegenüber dem Vorgehen im Forschungsvorhaben deutlich vereinfacht ist:

- Eluat-Probenahme bei 16 Fraktionen  
Fraktionen 3 bis 18 (entspricht einem Gesamtzeitraum von 8 h)
- je Fraktion eine 50 oder 100 mL-Probe
- nur neutrale Proben (ohne Zugabe einer Säure)
- Analyse von 8 Mischfraktionen aus je zwei Fraktionen  
3+4 / 5+6 / 7+8 / 9+10 / 11+12 / 13+14 / 15+16 / 17+18
- nur mit Gradientenmethode
- routinemäßig Vortest und Standardadditionsverfahren\*  
\* 5 äquidistante Konz. von 0,1 bis 0,9 µg/L in Eluatprobe;  $\Delta c = 0,2 \mu\text{g/L}$

Die vorgeschlagene Verfahrensbeschreibung ist in Anhang A.8 beschrieben.

Die isokratische Methode kann in Sonderfällen zur Absicherung von Analyseergebnissen genutzt werden, bei der Routineanalytik kann darauf verzichtet werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] Qualitätsmanagement - Arbeitsanweisung "Säulenversuch mit umgekehrter Fließrichtung" des Hygiene Instituts Gelsenkirchen (vom 26.11.2003).
- [2] Wagner, Robert: Inverser Säulenversuch zur Beurteilung der Auswirkungen von Bodeninjektionsmitteln auf Boden und Grundwasser - Laborvergleichsuntersuchung und ökotoxikologische Bewertung am Beispiel von Polyacrylaten/Acrylatgelinektionen. Dissertation, 2011, Freie Universität Berlin, Fachbereich Geowissenschaften.
- [3] DIBt: "Hinweise für die Prüfstellen zur Durchführung des Säulenversuchs mit umgekehrter Fließrichtung zur Durchführung der ökotoxikologischen Tests am Eluat " (Fassung September 2013).
- [4] DIN EN ISO 14362-1:2017-05; Textilien - Verfahren für die Bestimmung bestimmter aromatischer Amine aus Azofarbstoffen - Teil 1: Nachweis der Verwendung bestimmter Azofarbstoffe mit und ohne Extraktion der Fasern (ISO 14362-1:2017); Deutsche Fassung EN ISO 14362-1:2017
- [5] DIN EN ISO 17234-1:2019-04 – Entwurf; Leder - Chemische Prüfungen zur Bestimmung bestimmter Azofarbstoffe in gefärbten Ledern - Teil 1: Bestimmung bestimmter aromatischer Amine aus Azofarbstoffen (ISO/DIS 17234-1:2019); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17234-1:2019
- [6] DIN EN 17163:2019-05; Papier, Pappe und Faserstoff - Bestimmung von primären aromatischen Aminen in Wasserextrakten mittels LC-MS; Deutsche Fassung EN 17163:2019
- [7] DIN ISO 16000-39:2020-12; Innenraumluftverunreinigungen - Teil 39: Bestimmung von Aminen - Analyse von Aminen durch (Ultra-) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender oder Tandem-Massenspektrometrie; Englischer Titel: Indoor air - Part 39: Determination of amines - Analysis of amines by (ultra-) high-performance liquid chromatography coupled to high resolution or tandem mass spectrometry; Ausgabedatum 2020-12; 19 Seiten
- [8] 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-Institut für Bauphysik -IBP-, Holzkirchen (2016); 82 S.; Fraunhofer IRB Verlag; ISBN 978-3-8167-9853-8; IBP-Berichtsnummer: BBHB-017/2016/281; DIBt-Projektnummer: P 52-5-20.85-1453/14
- [9] Andreas Schmohl, Sabine Hübner: „Freisetzung von aromatischen Aminen aus Bauwerksabdichtungen – Erarbeitung eines Verfahrens zur analytischen Quantifizierung als Grundlage für die Bewertung im Rahmen der abZ“; Bauforschung, Band T 3367; Fraunhofer-Institut für Bauphysik -IBP-, Holzkirchen (2019) 77 S.; Fraunhofer IRB Verlag; ISBN 978-3-

7388-0288-7; IBP-Berichtsnummer: UHS-008/2018/282; DIBt-Projektnummer: P 52-5-20.85.1 2009/17

- [10] Liste der krebserzeugenden, mutagenen und reproduktions-toxischen Stoffe (KMR-Stoffe); Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung; KMR-Liste Februar 2021; online zum Download erhältlich, siehe <https://www.dguv.de/ifa/fachinfos/kmr-liste/index.jsp>; Ausgabedatum: 2021.02; Herausgeber: DGUV; Seitenzahl: 45; Format: DIN A4; Sprache: Deutsch; Webcode: p012750
- [11] DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung; Ausgabedatum 2008-11; 28 Seiten
- [12] DIN 32633:2013-05: Chemische Analytik - Verfahren der Standardaddition - Verfahren, Ausgabedatum 2013-05; 16 Seiten

## Anhang

### A.1 Anhang 1: Kalibrierung (0,01 bis 1,8 µg/L)

In den Diagrammen im Anhang A.1 sind für die 15 stabilen Amine die erhaltenen Flächenintegrale gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Der (nominale) Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,8 µg/L ist in drei sich überlappende, jeweils äquidistante Konzentrationsbereiche eingeteilt:

- 0,01 bis 0,09 µg/L
- 0,05 bis 0,45 µg/L
- 0,20 bis 1,80 µg/L

Je Messpunkt wurde 3 Injektionen verwendet. Ausreißer wurden mit einem Ausreißertest eliminiert (je ein Messpunkt bei A11, s. Bild 54 und bei A19, s. Bild 59).

Die in den Diagrammen angegebenen nominalen Konzentrationen entsprechen einer bestimmten Verdünnungsstufe bei einer Einwaage von 10 mg in der Stammlösung. Die tatsächlichen Konzentrationen müssen mit der tatsächlichen Einwaage und einer ggf. abweichenden Zudosierung im ersten Verdünnungsschritt berechnet werden. Die Konzentrationen (x-Achsen) in den folgenden Abbildungen sind entsprechend korrigiert.

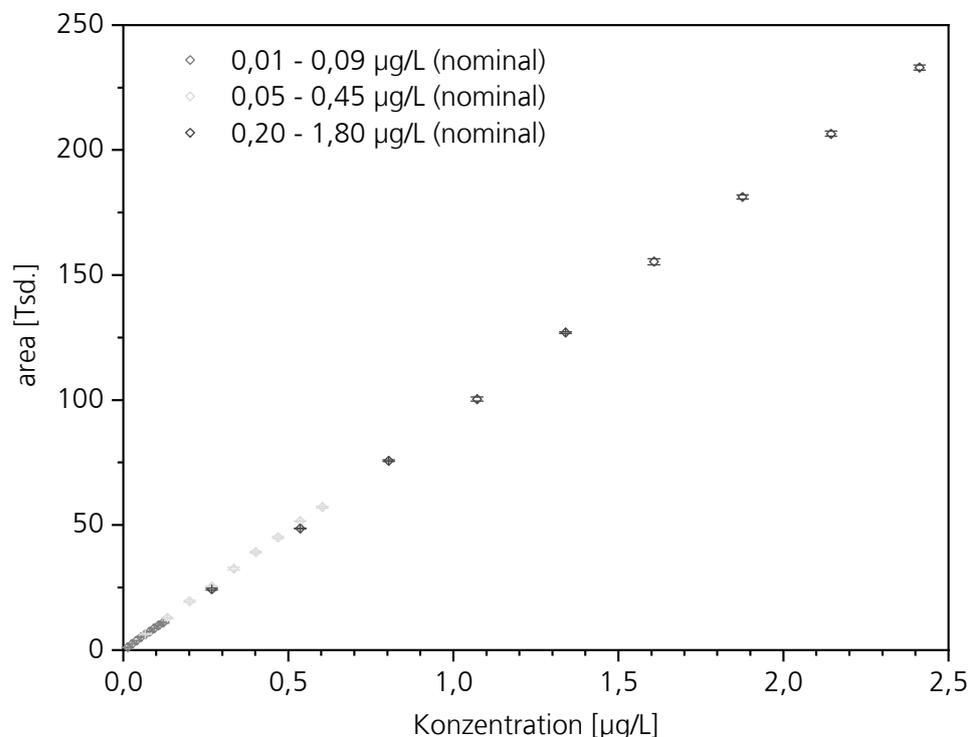


Bild 49:  
Kalibrierung von o-Toluidin (A01) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.

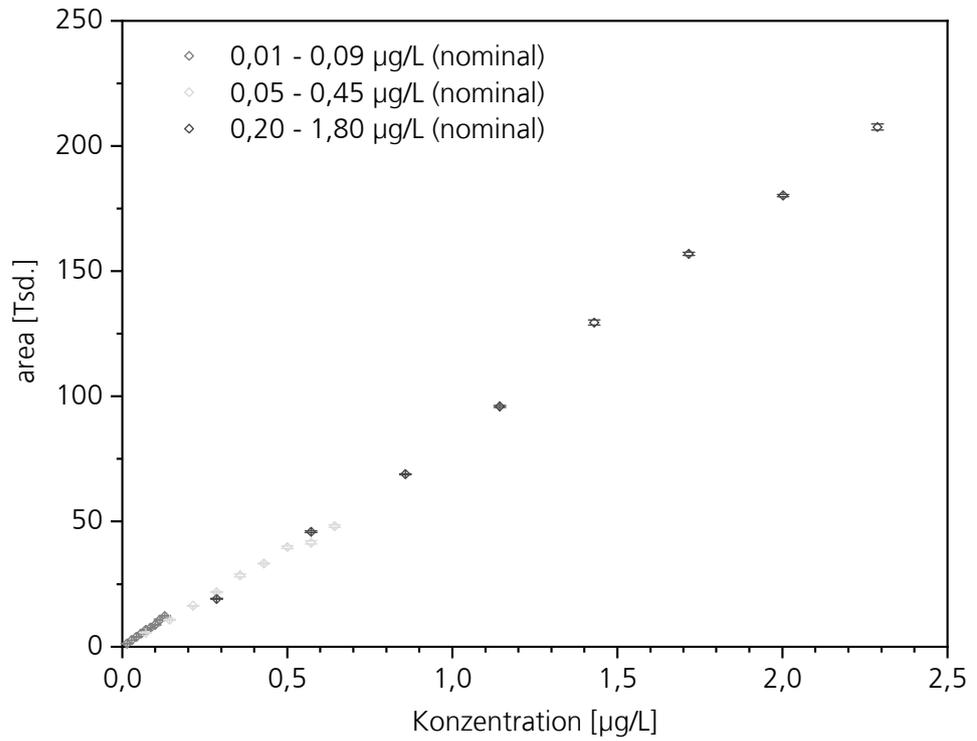


Bild 50:  
Kalibrierung von 2,4-TDA (A04) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.

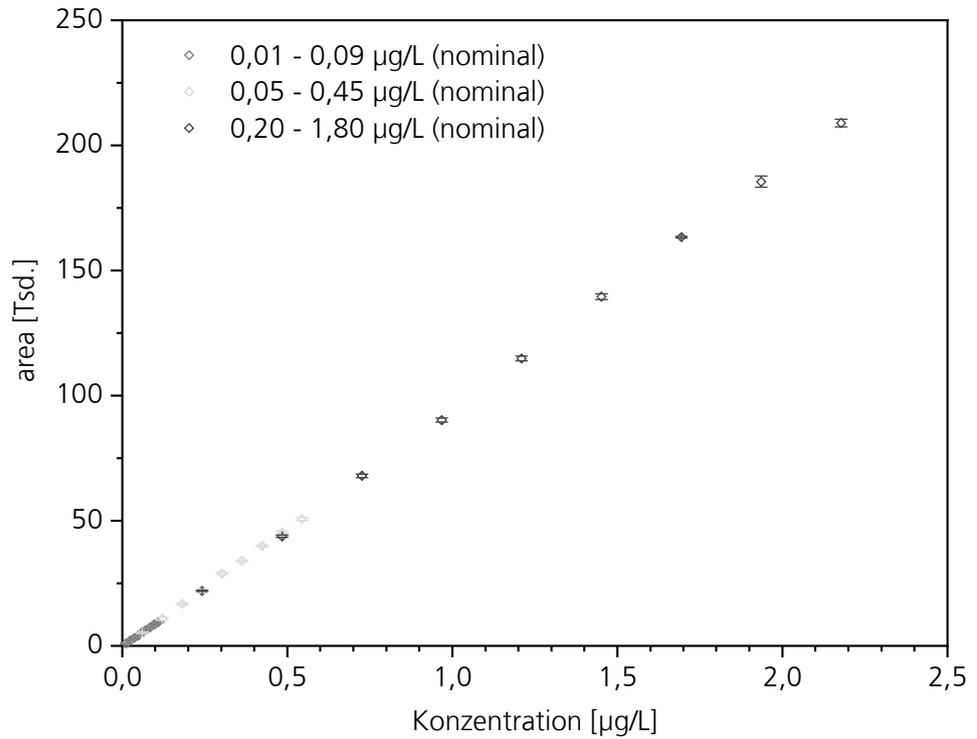


Bild 51:  
Kalibrierung von 4-Chloranilin (A06) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.

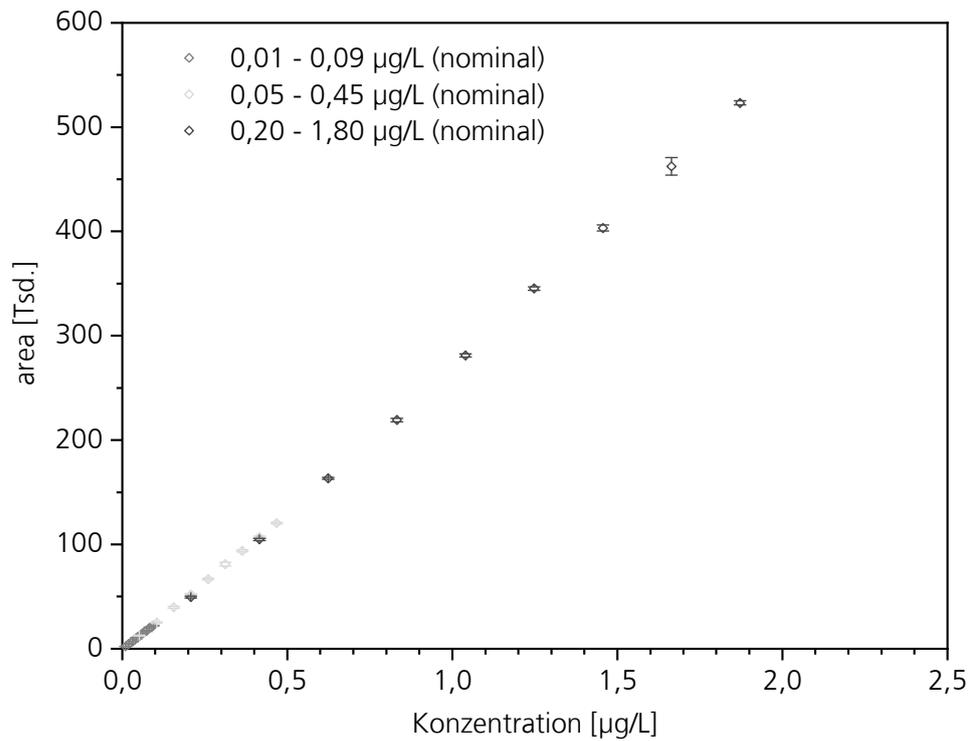


Bild 52:  
Kalibrierung von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

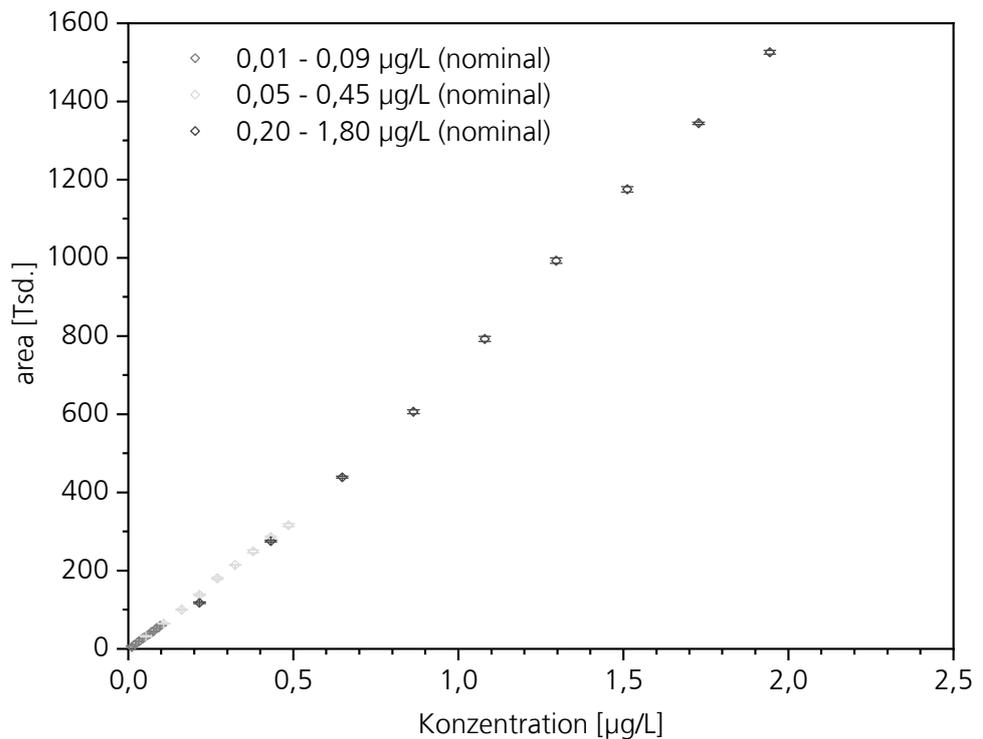


Bild 53:  
Kalibrierung von p-Kresidin (A08) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

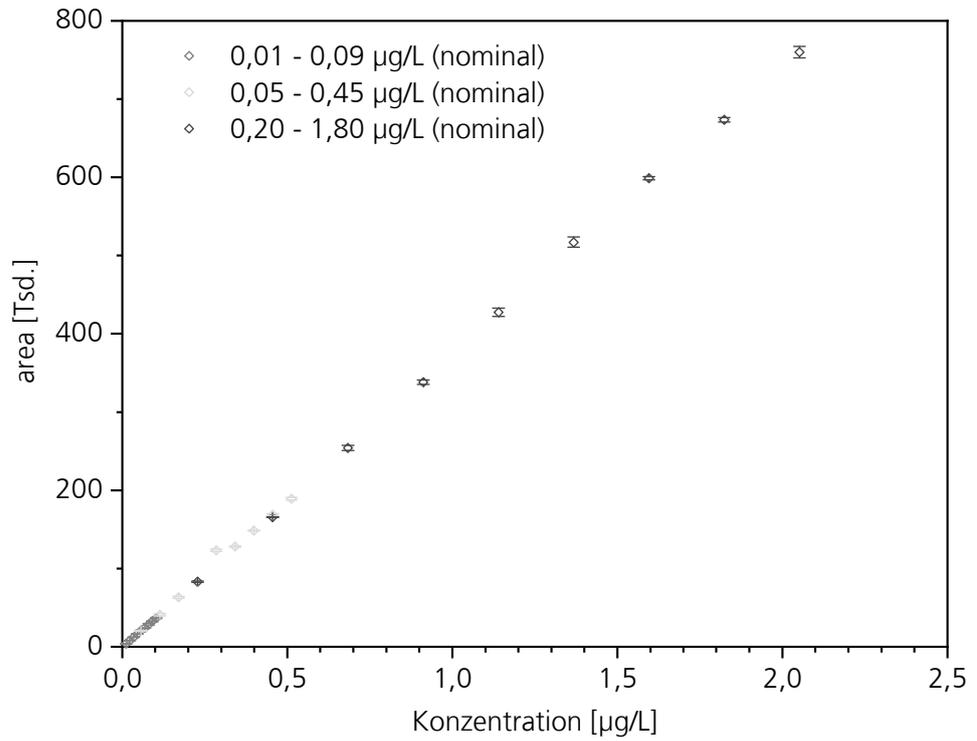


Bild 54:  
Kalibrierung von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

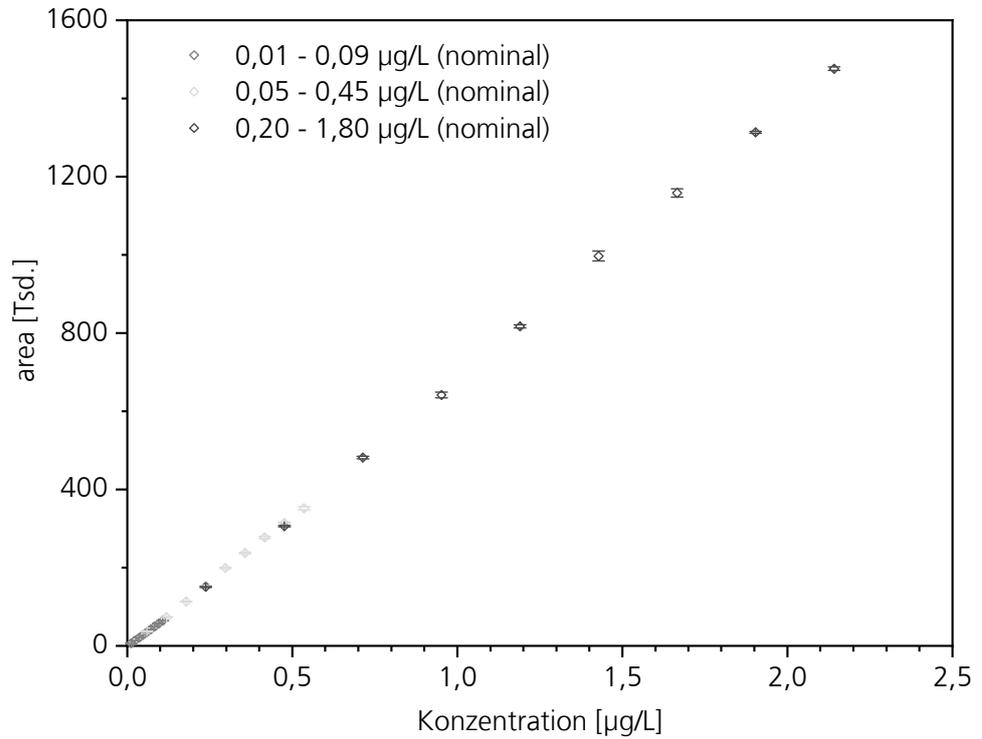


Bild 55:  
Kalibrierung von 2-Naphthylamin (A13) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

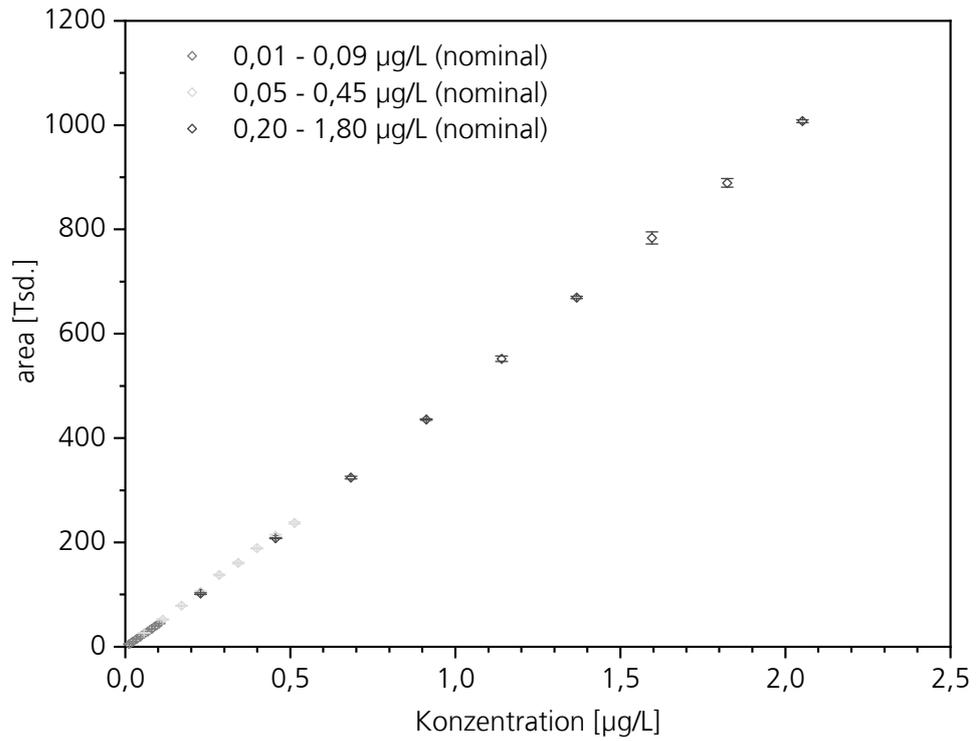


Bild 56:  
Kalibrierung von 4-Aminobiphenyl (A14) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

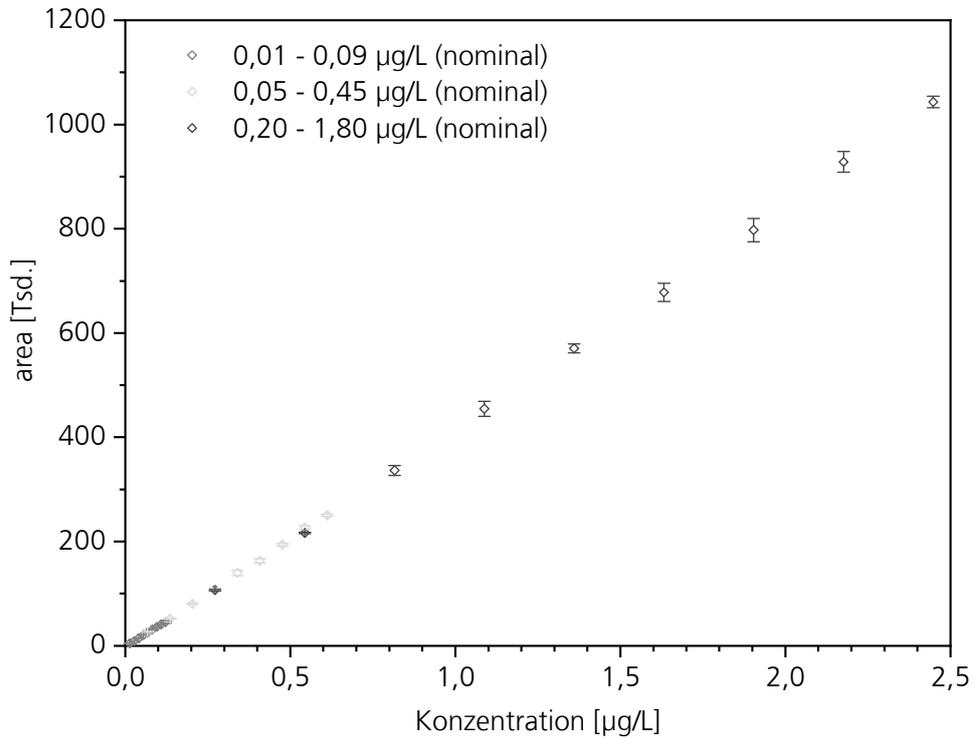


Bild 57:  
Kalibrierung von 4,4'-MDA (A16) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

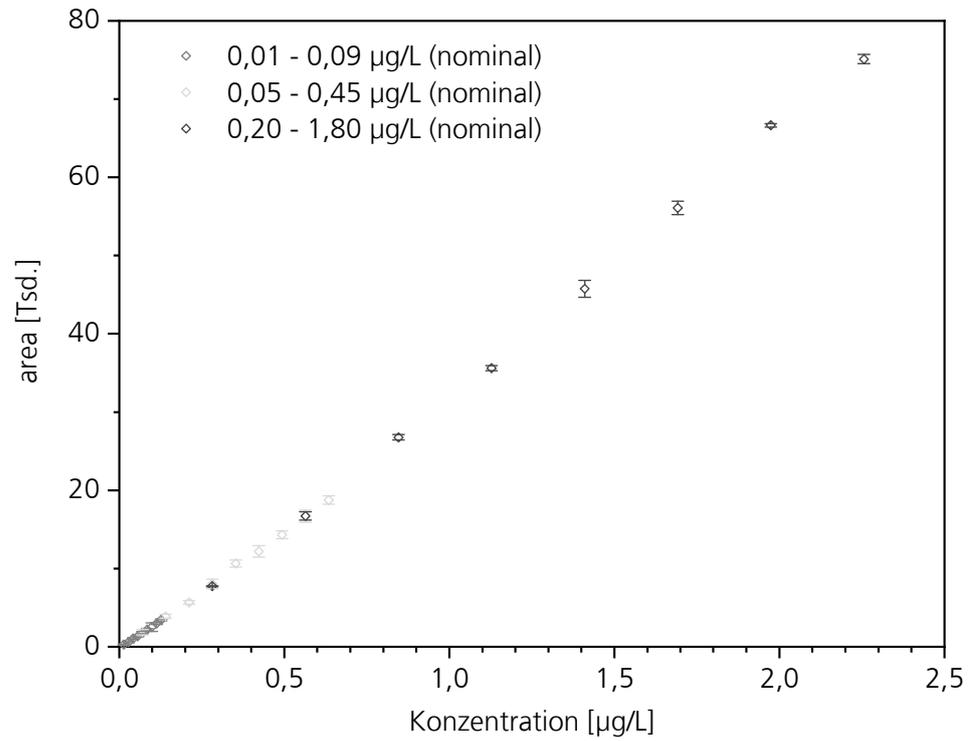


Bild 58:  
Kalibrierung von 4,4'-Oxydianilin (A17) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

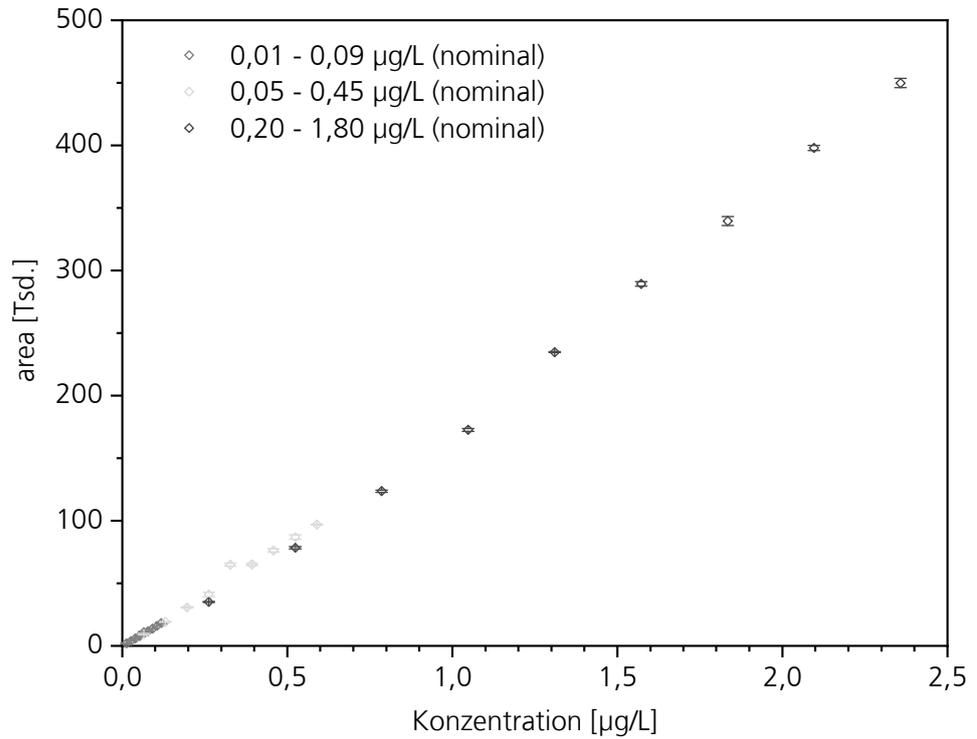


Bild 59:  
Kalibrierung von 4,4'-Thiodianilin (A19) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

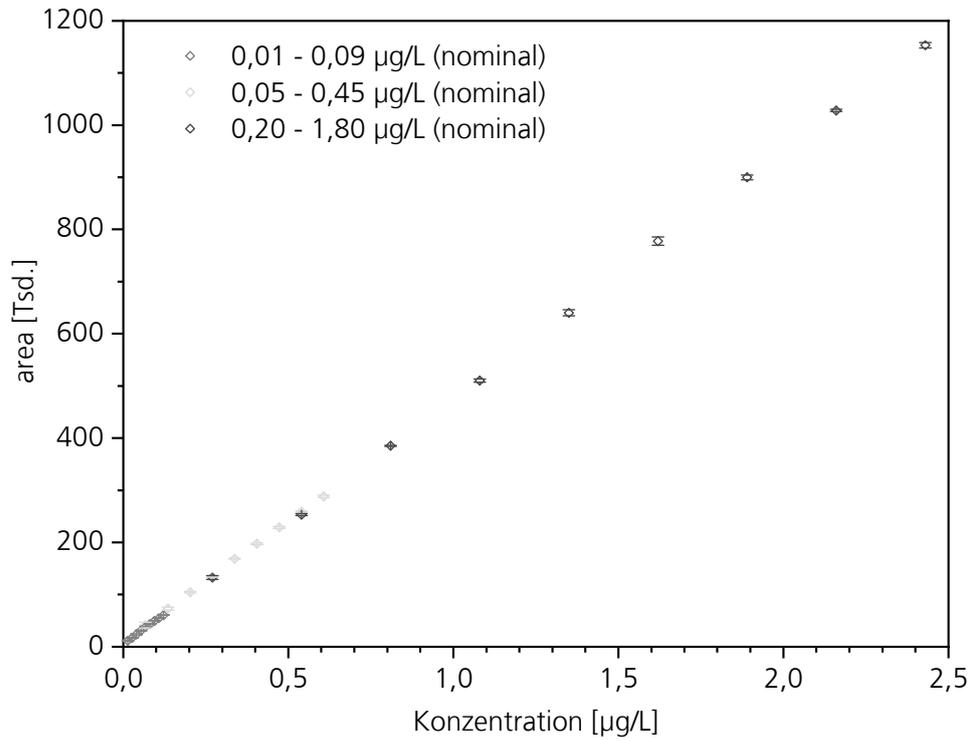


Bild 60:  
Kalibrierung von o-Aminoazotoluol (A20) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

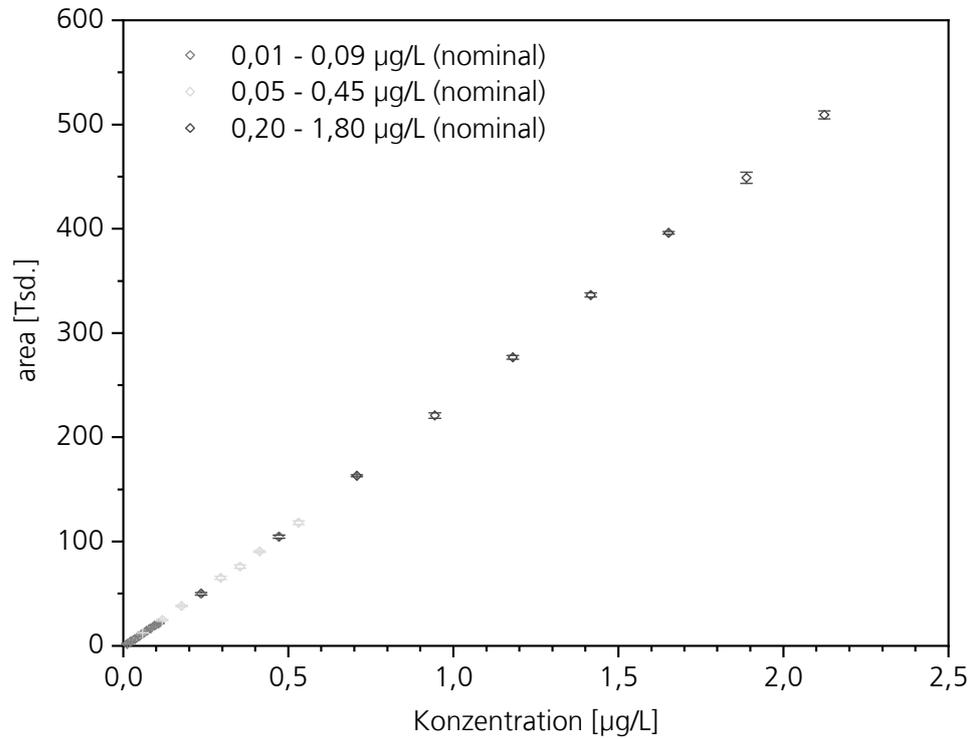


Bild 61:  
Kalibrierung von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

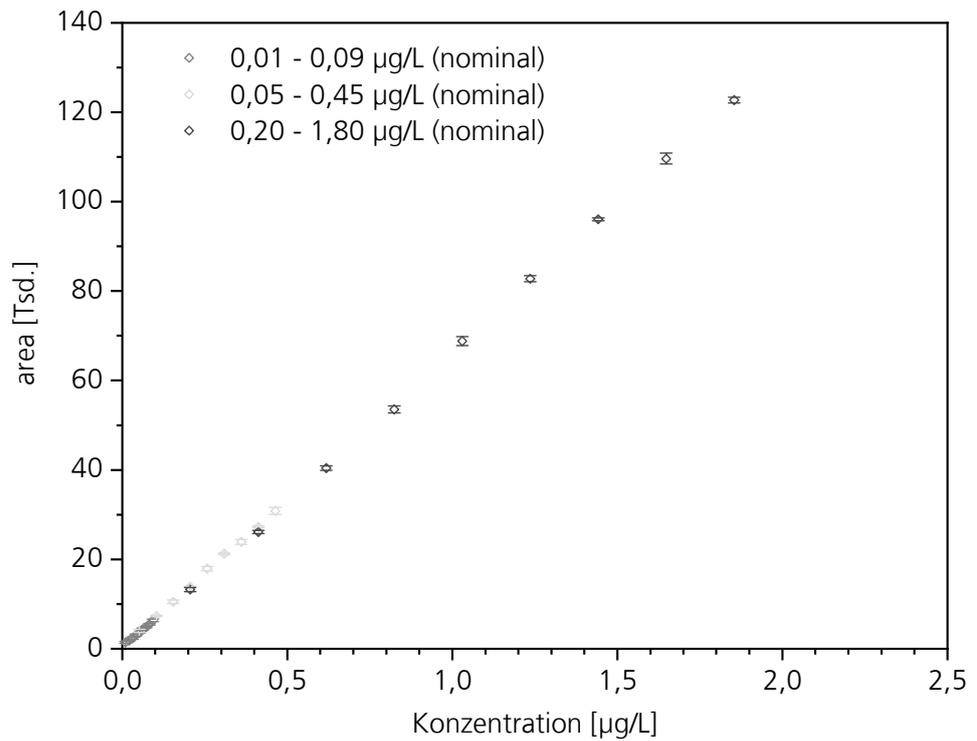


Bild 62:  
Kalibrierung von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

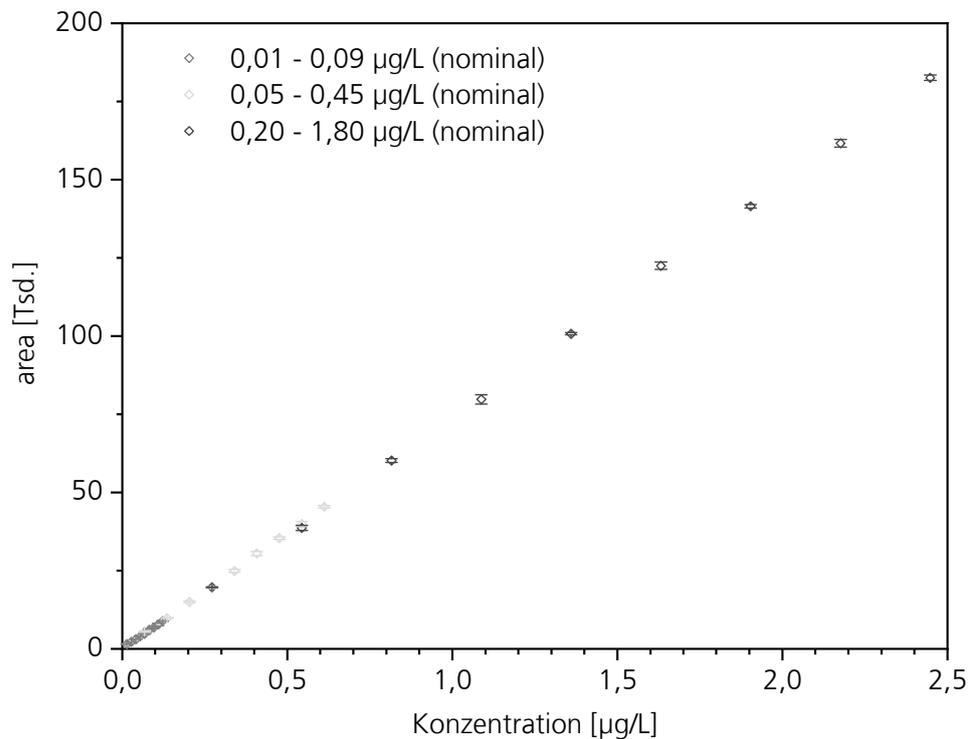


Bild 63:  
Kalibrierung von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.

## A.2 Anhang 2: Stabilität der Stammlösungen

In den folgenden Bildern (Bild 64 bis Bild 78) ist die Wiederfindung der einzelnen stabilen Aminen in den Stammlösungen (s. Tabelle 3) gegen das Alter der Stammlösungen aufgetragen. Der „Ausgangswert“ für  $t = 0$  entspricht den im Juni 2021 (Jun21) angesetzten Stammlösungen. Frühere Stammlösungen wurden im Februar 2021 (Feb21), im Dezember 2020 (Dez20) und im März 2020 (Mrz20) angesetzt.

Die in den Diagrammen angegebenen nominalen Konzentrationen entsprechen einer bestimmten Verdünnungsstufe bei einer Einwaage von 10 mg in der Stammlösung. Die tatsächlichen Konzentrationen müssen mit der tatsächlichen Einwaage und einer ggf. abweichenden Zudosierung im ersten Verdünnungsschritt berechnet werden. Für die Berechnung der Wiederfindung wurden die gemessenen Konzentrationen (je 3 Injektionen) mit den rechnerisch erwarteten Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt. Zusätzlich wurde mit dem Messsignal der Juni-Stammlösungen (3 Injektionen vor und 3 Injektionen nach den anderen Stammlösungsverdünnungen) normiert, so dass der „Ausgangswert“ einer Wiederfindung von 100 % entspricht. Für die nominale Konzentration 0,2  $\mu\text{g/L}$  wurde eine äquidistante 9-Punkt-Kalibrierung von 0,05 bis 0,45  $\mu\text{g/L}$  eingesetzt. Für die nominale Konzentration 1,0  $\mu\text{g/L}$  wurde eine äquidistante 9-Punkt-Kalibrierung von 0,2 bis 1,8  $\mu\text{g/L}$  eingesetzt. Die Interpretation der Ergebnisse ist in Ziffer 4.1.6 auf Seite 53 zu finden.

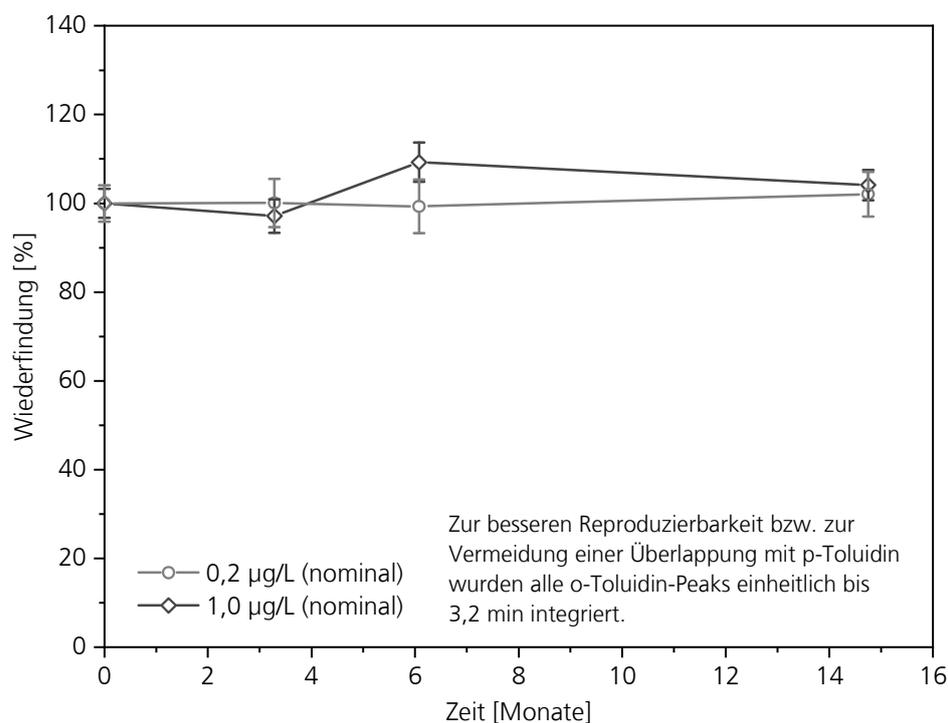


Bild 64:  
Stabilität von o-Toluidin (A01) in der Stammlösung.

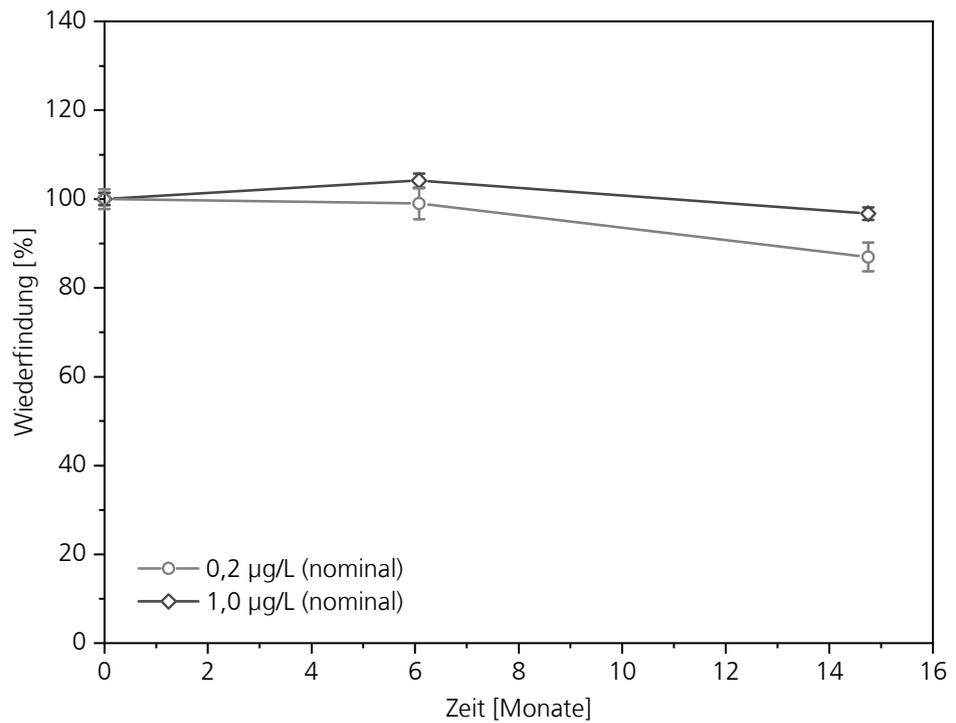


Bild 65:  
Stabilität von 2,4-TDA (A04) in der Stammlösung.

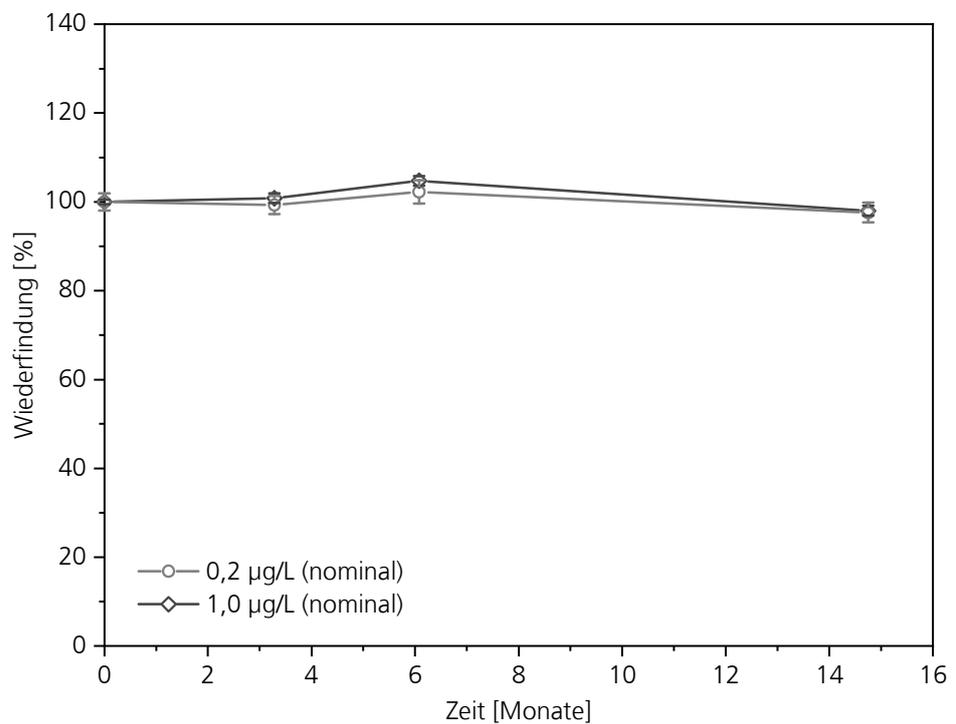


Bild 66:  
Stabilität von 4-Chloranilin (A06) in der Stammlösung.

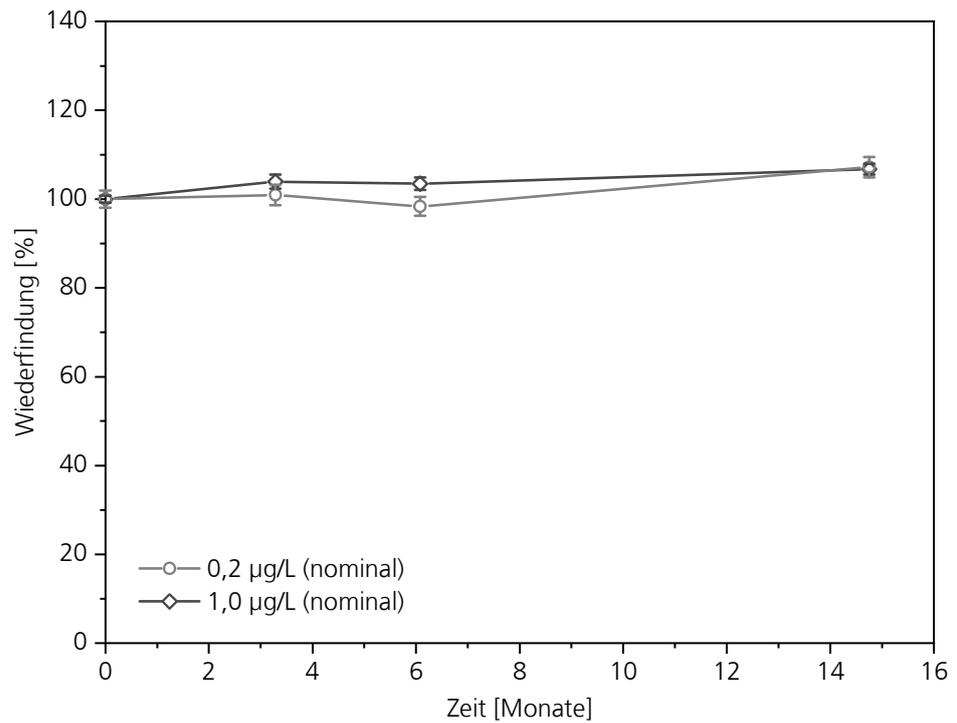


Bild 67:  
Stabilität von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) in der Stammlösung.

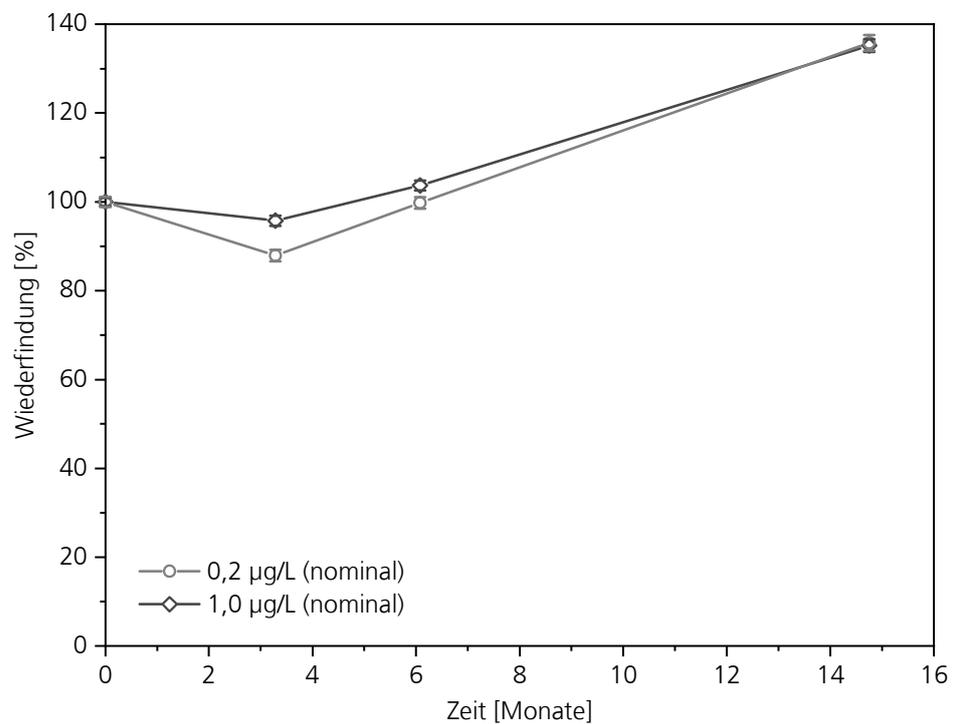


Bild 68:  
Stabilität von p-Kresidin (A08) in der Stammlösung.

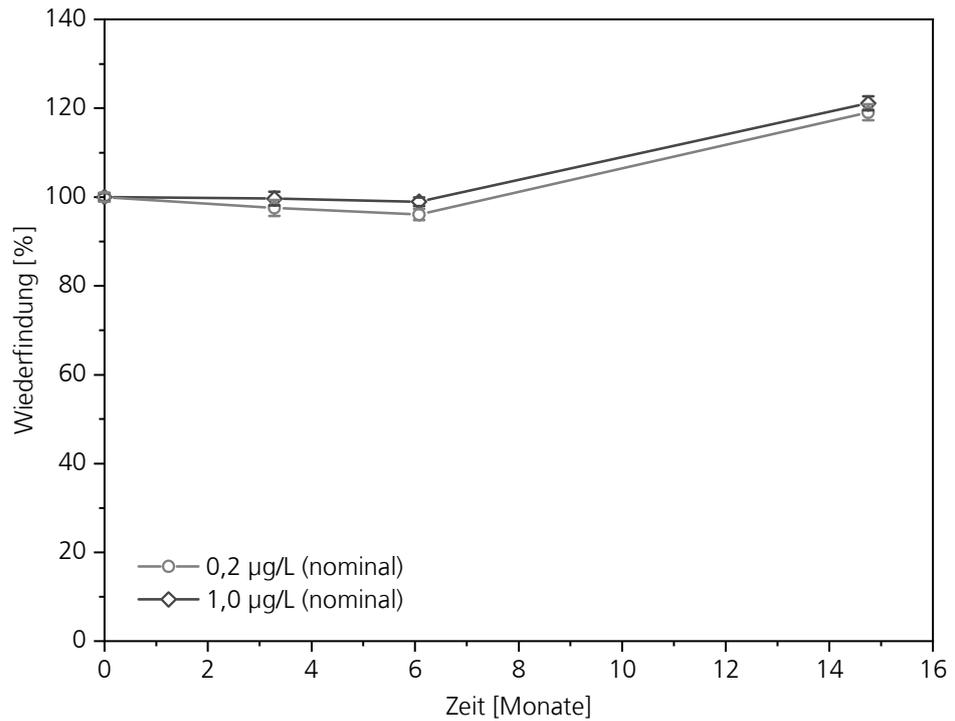


Bild 69:  
Stabilität von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) in der Stammlösung.

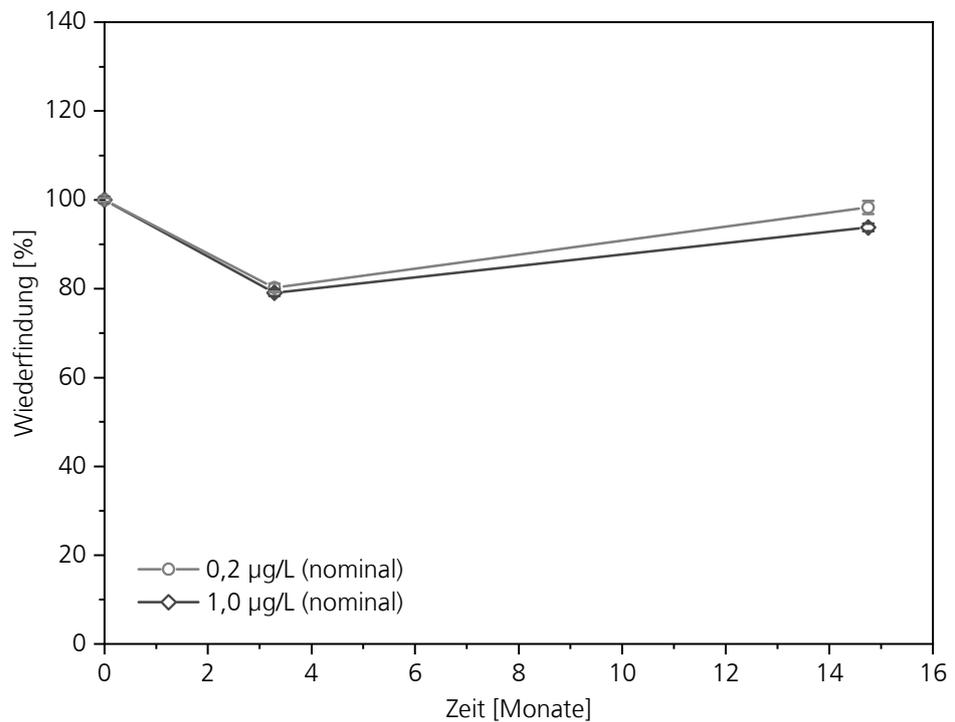


Bild 70:  
Stabilität von 2-Naphthylamin (A13) in der Stammlösung.

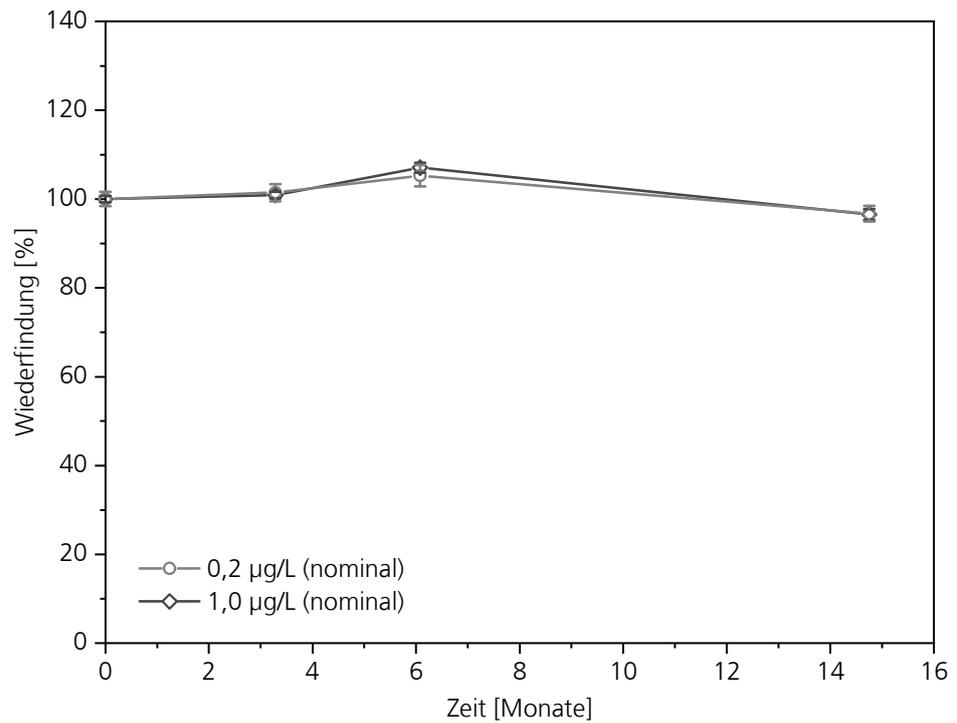


Bild 71:  
Stabilität von 4-Aminobiphenyl (A14) in der Stammlösung.

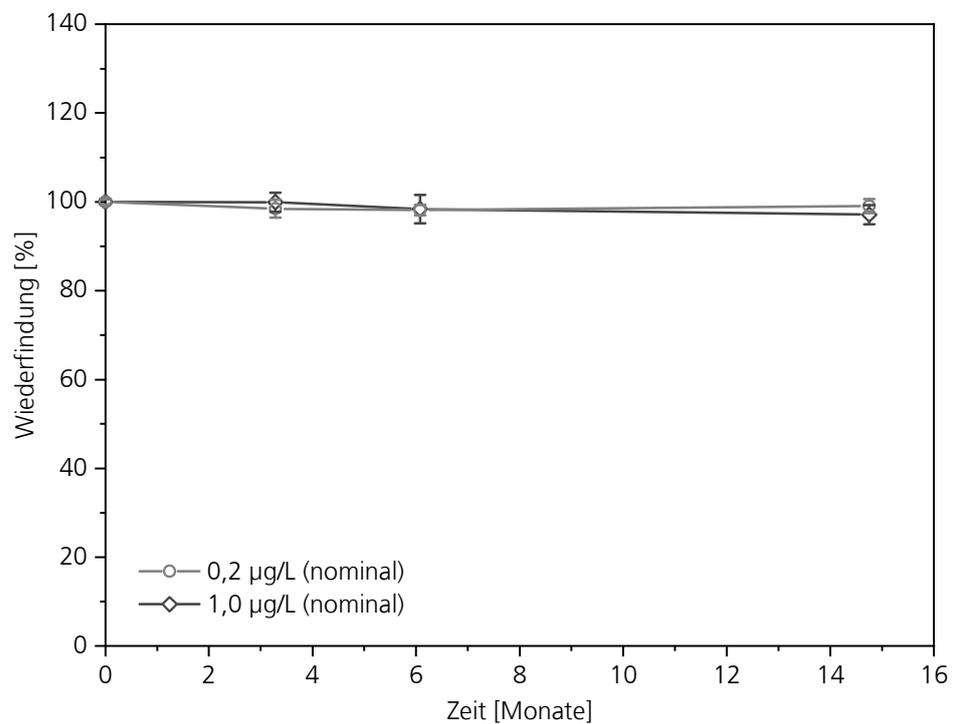


Bild 72:  
Stabilität von 4,4'-MDA (A16) in der Stammlösung.

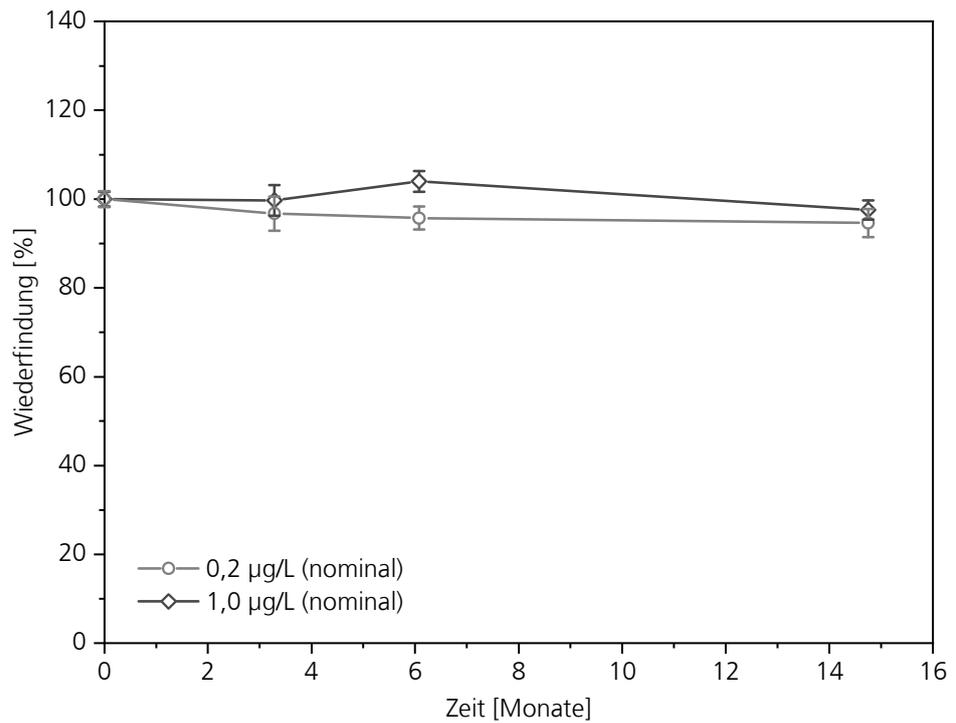


Bild 73:  
Stabilität von 4,4'-Oxydianilin (A17) in der Stammlösung.

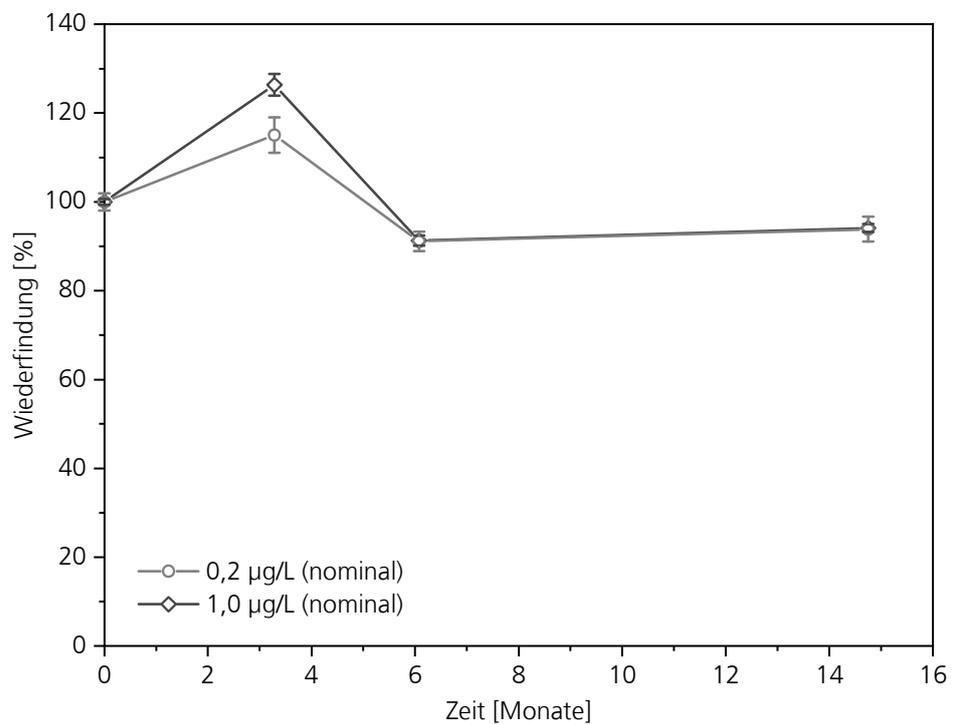


Bild 74:  
Stabilität von 4,4'-Thiodianilin (A19) in der Stammlösung.

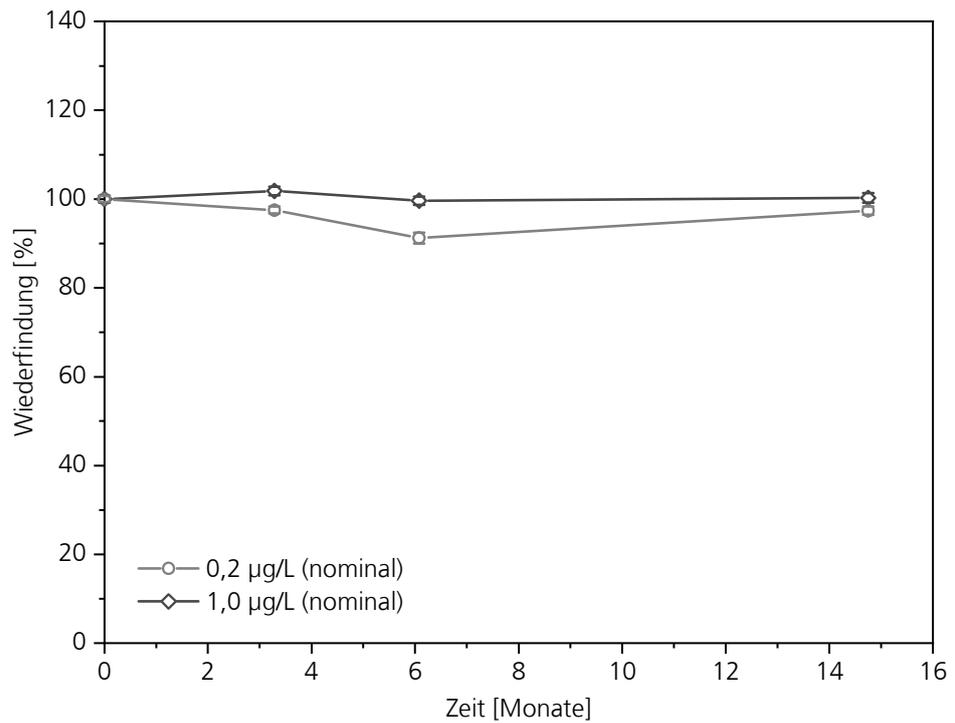


Bild 75:  
Stabilität von o-Aminoazotoluol (A20) in der Stammlösung.

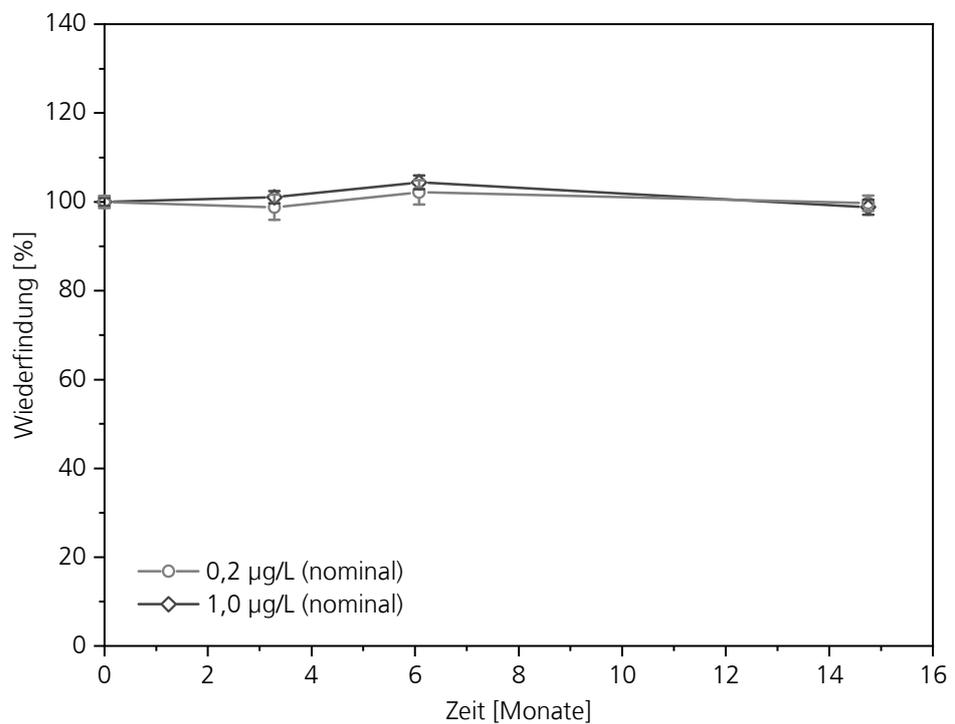


Bild 76:  
Stabilität von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) in der Stammlösung.

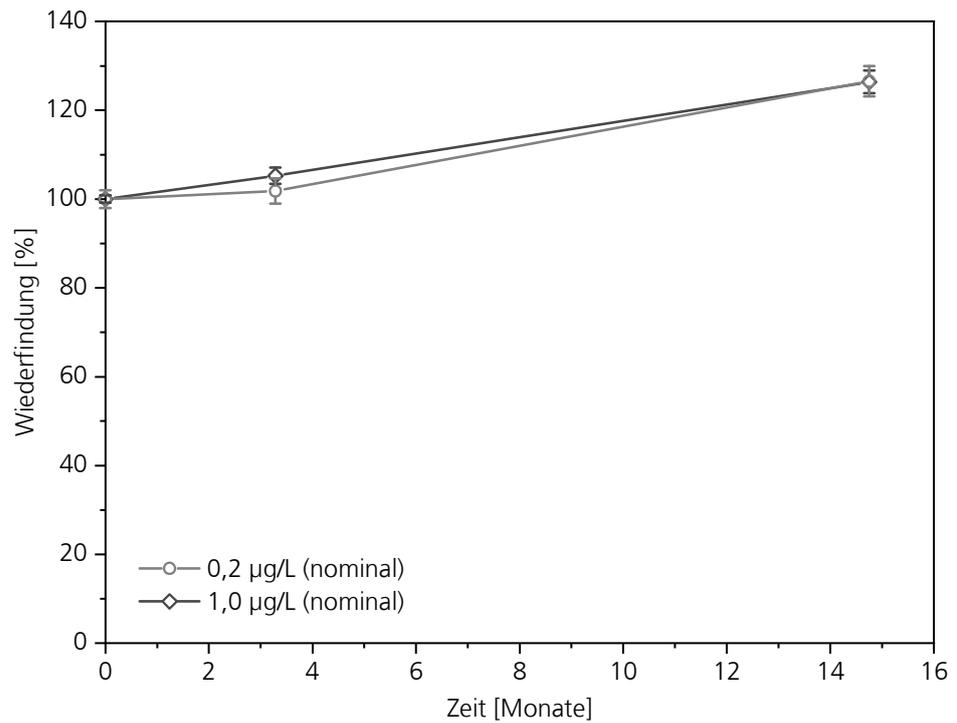


Bild 77:  
Stabilität von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) in der Stammlösung.

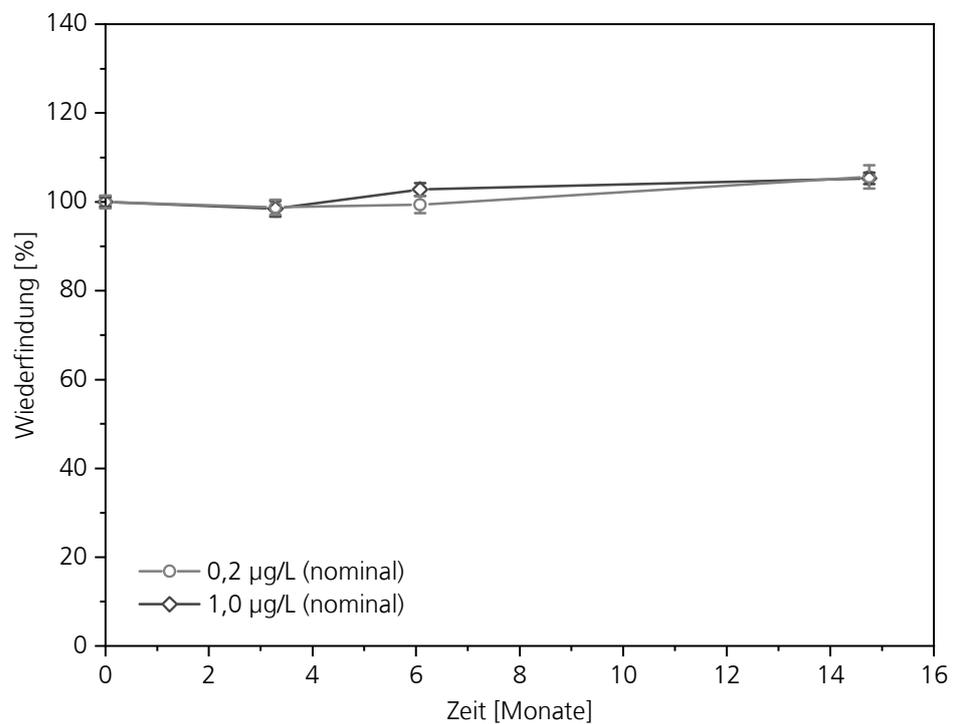


Bild 78:  
Stabilität von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) in der Stammlösung.

### A.3 Anhang 3: Wiederfindung in den Reinstwasserproben für den Methodenvergleich im Vergleich zu direkt vor der Analyse frisch angesetzten Lösungen

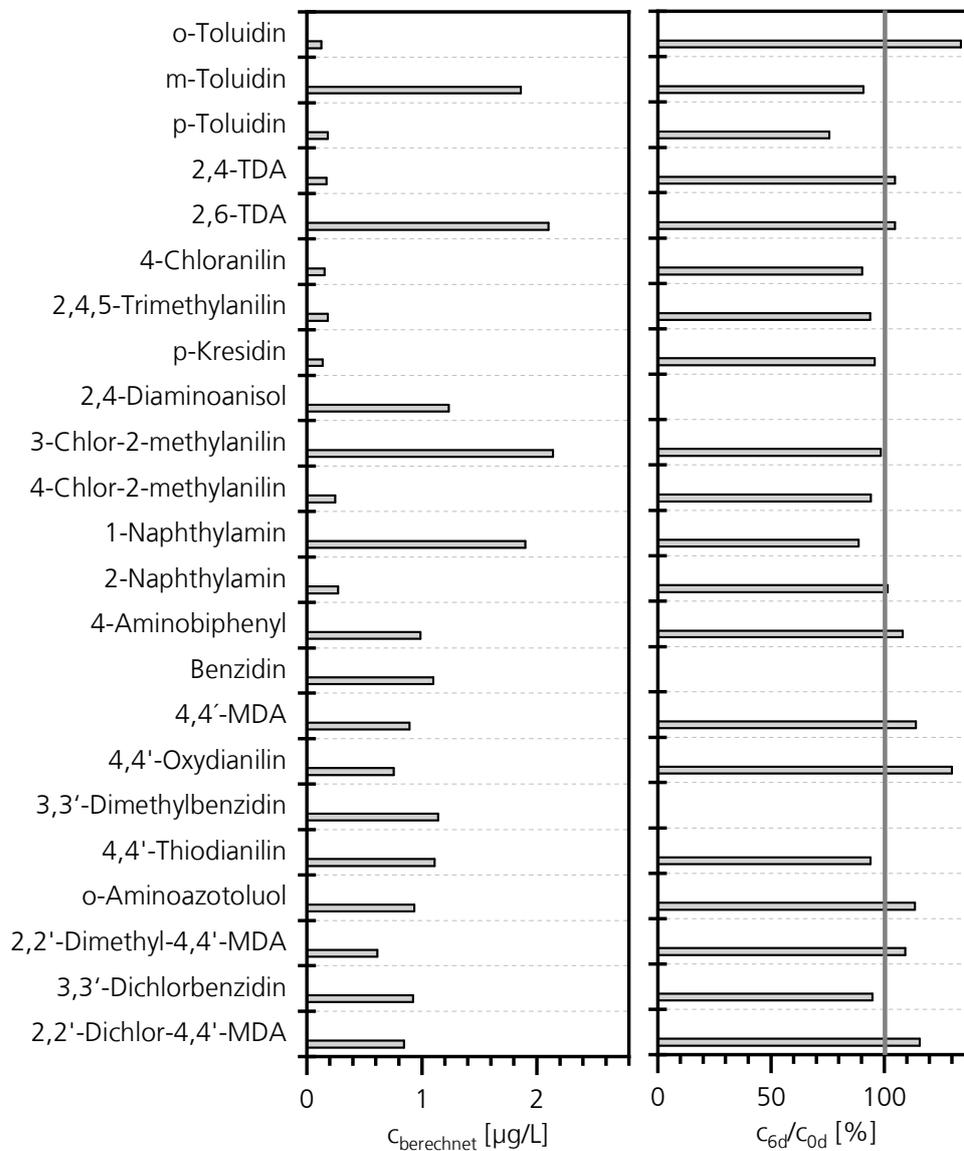


Bild 79:  
Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung A.

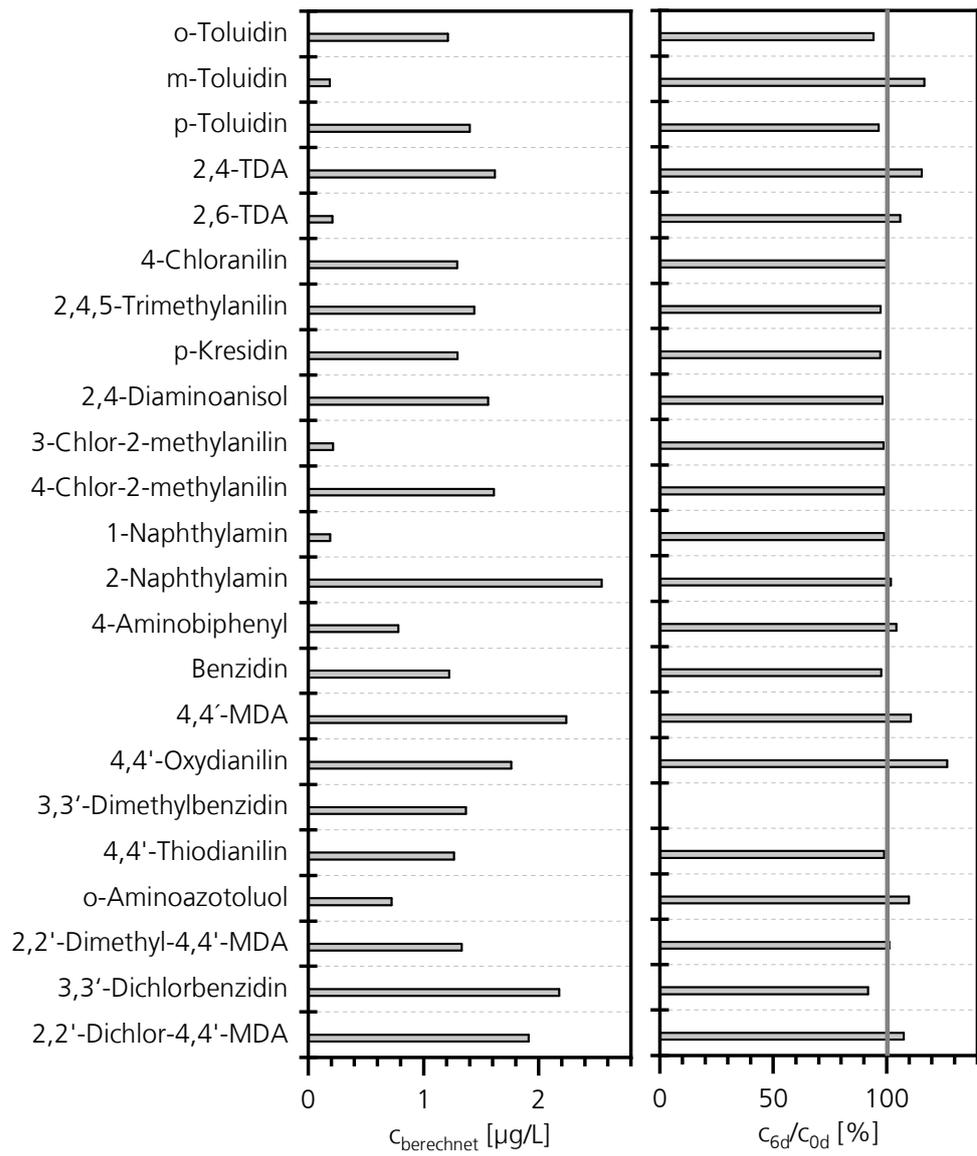


Bild 80:  
Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung B.

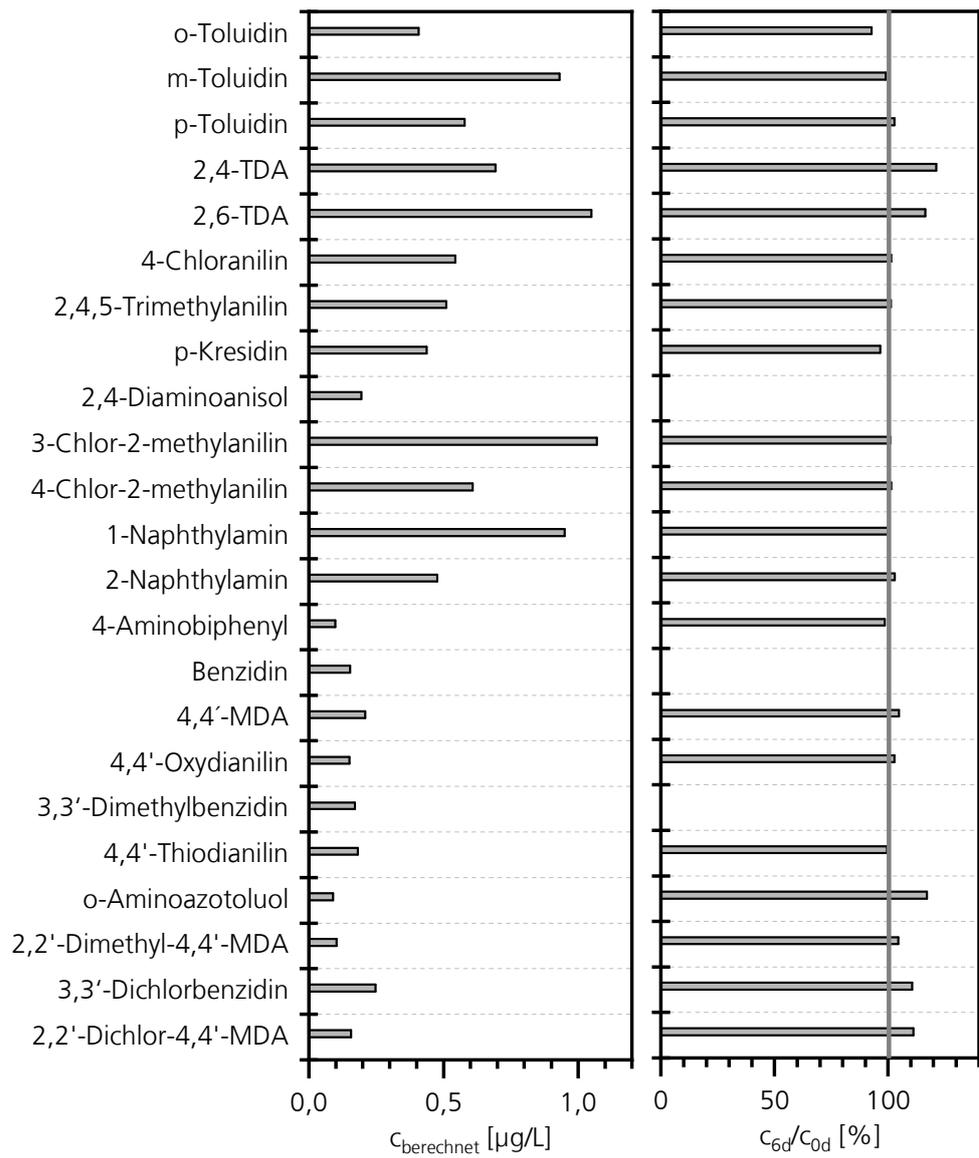


Bild 81:  
Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung C.

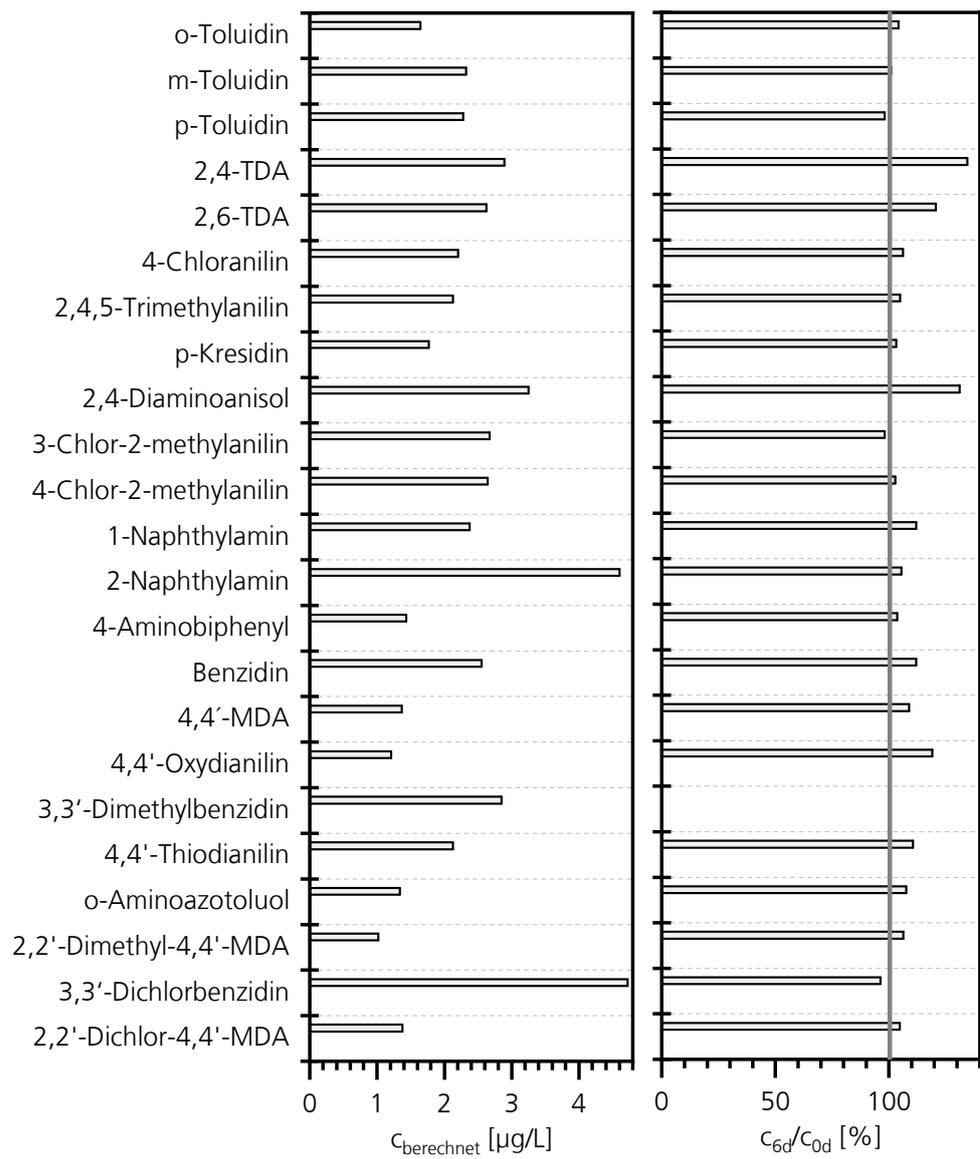


Bild 82:  
Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung D.

## A.4 Anhang 4: Kalibrierung für Methodenvergleich

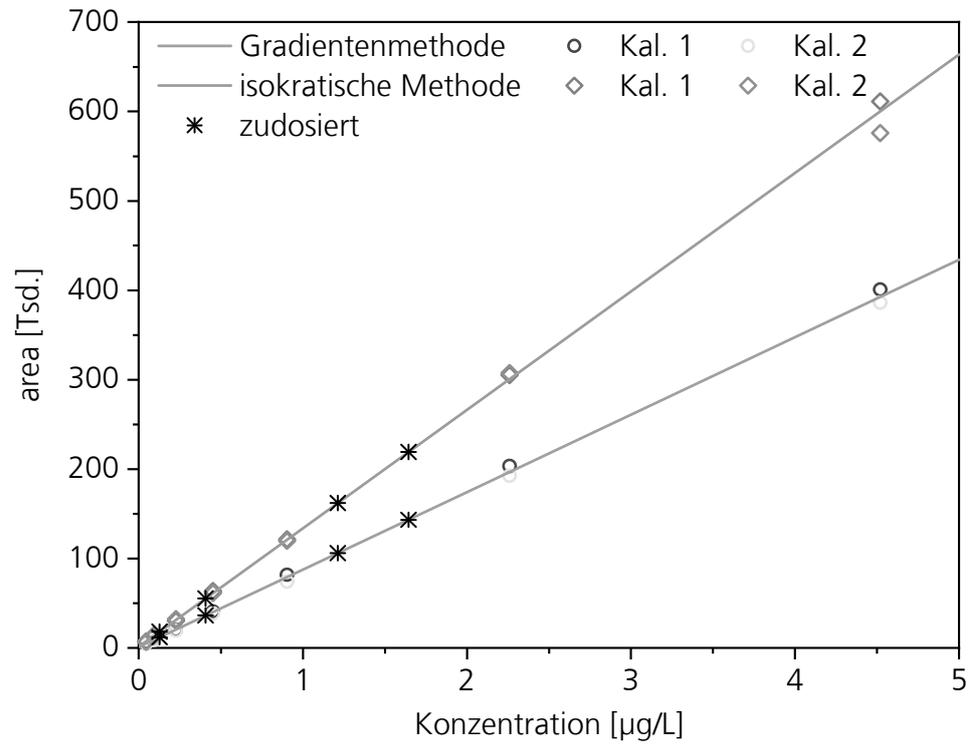


Bild 83:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für o-Toluidin (A01).

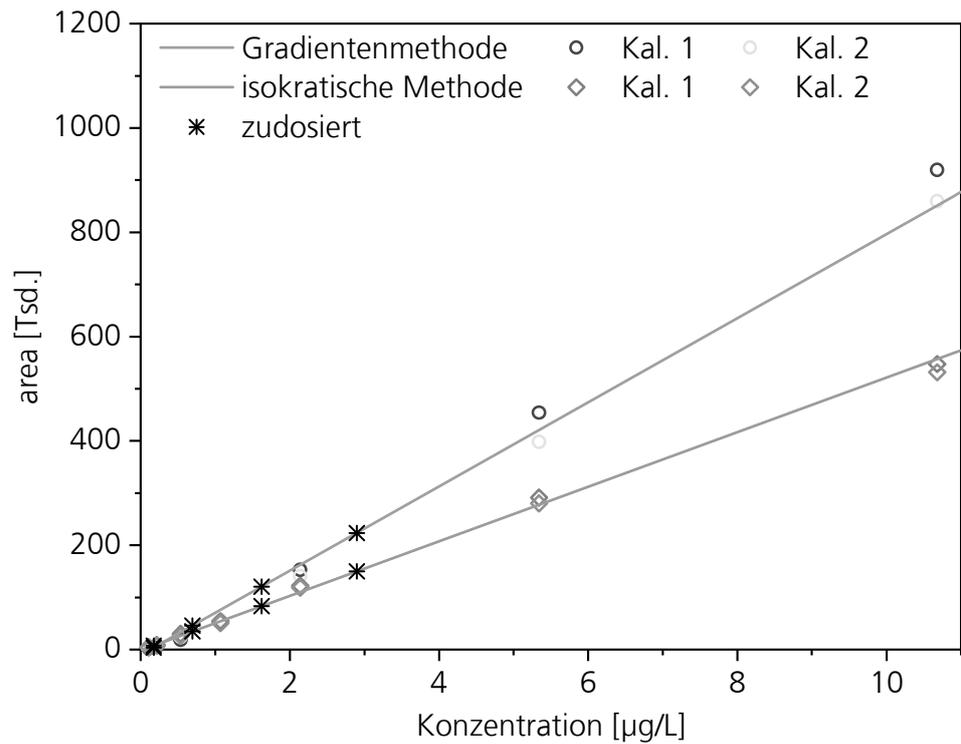


Bild 84:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,4-TDA (A04).

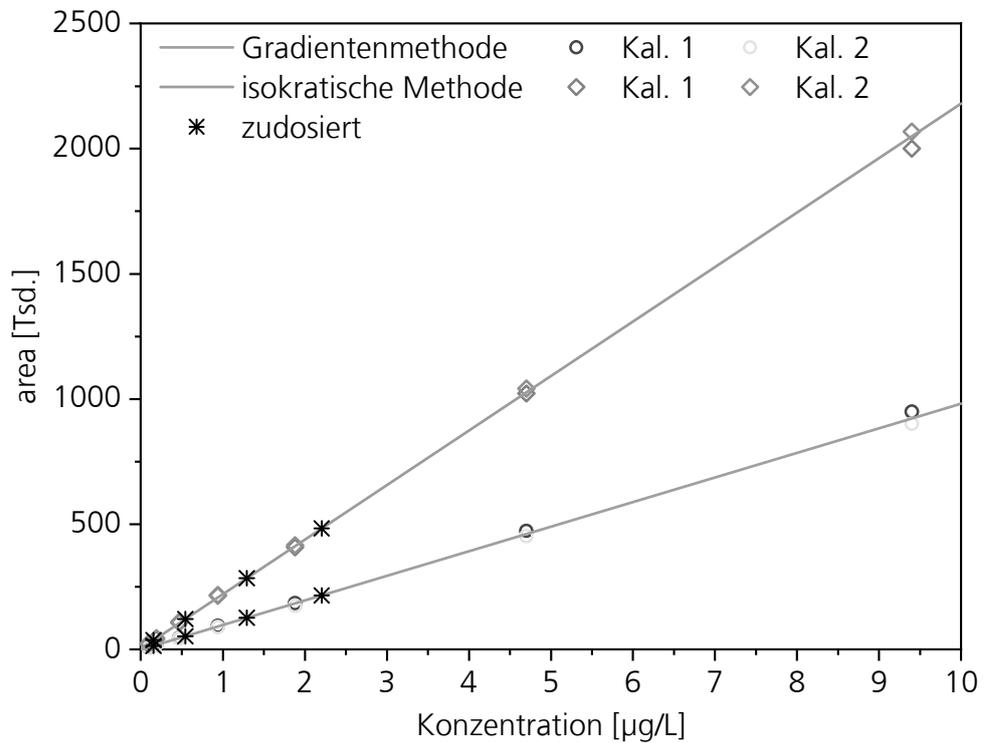


Bild 85:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Chloranilin (A06).

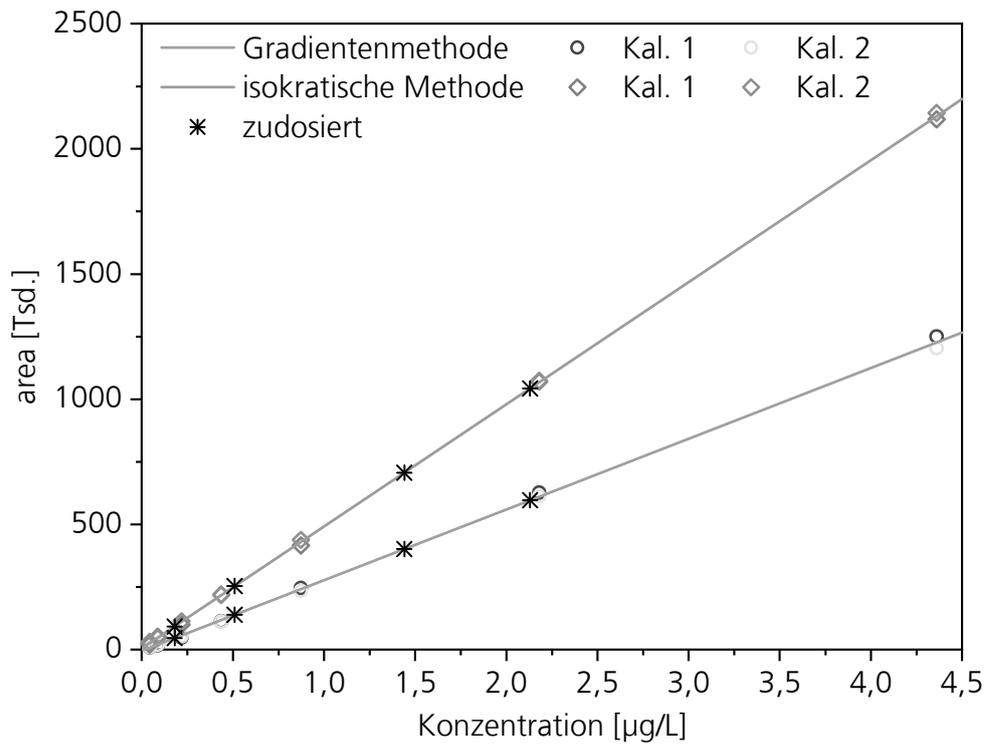


Bild 86:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,4,5-Trimethylanilin (A07).

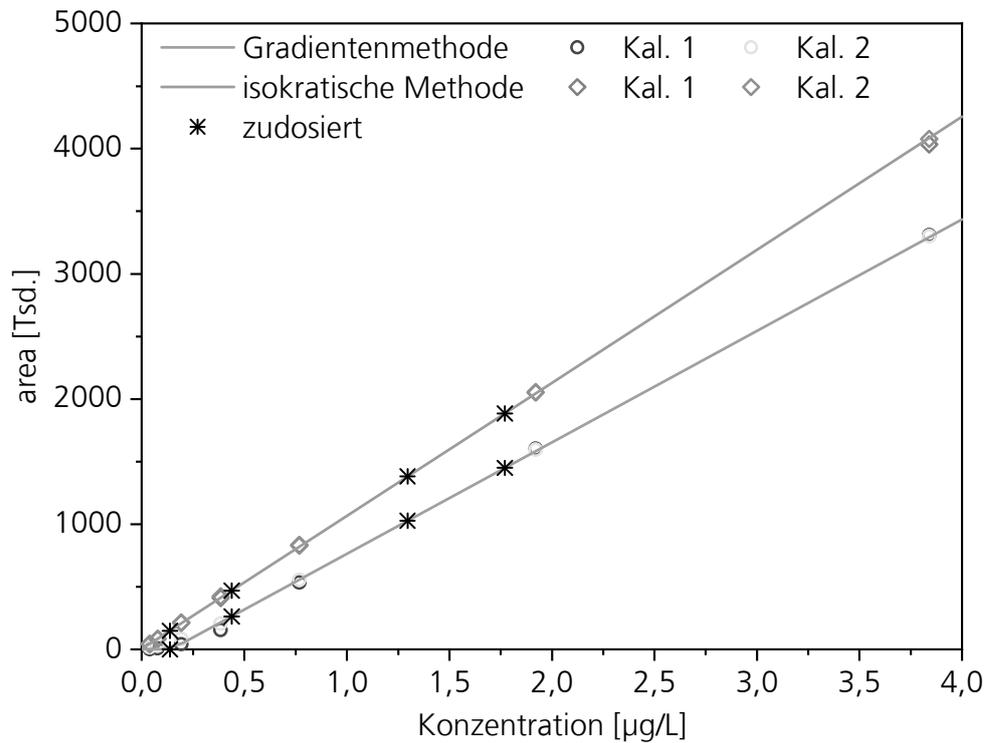


Bild 87:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für p-Kresidin (A08).

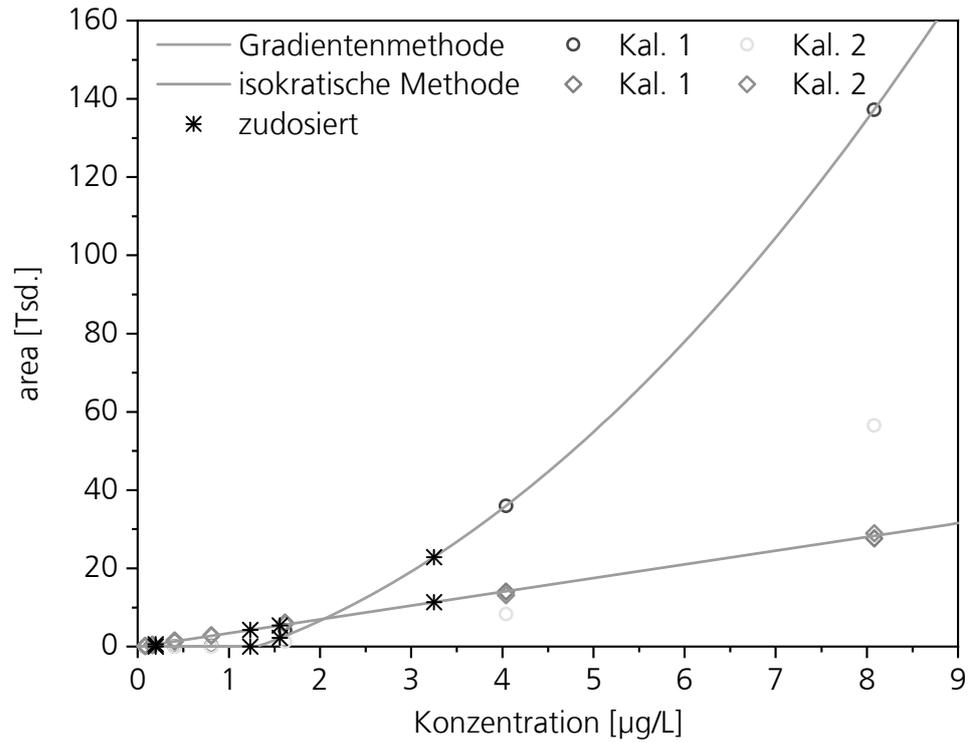


Bild 88:  
UPLC-MS/MS-Kalibrierkurve (quadratisch) für 2,4-Diaminoanisol (A09).

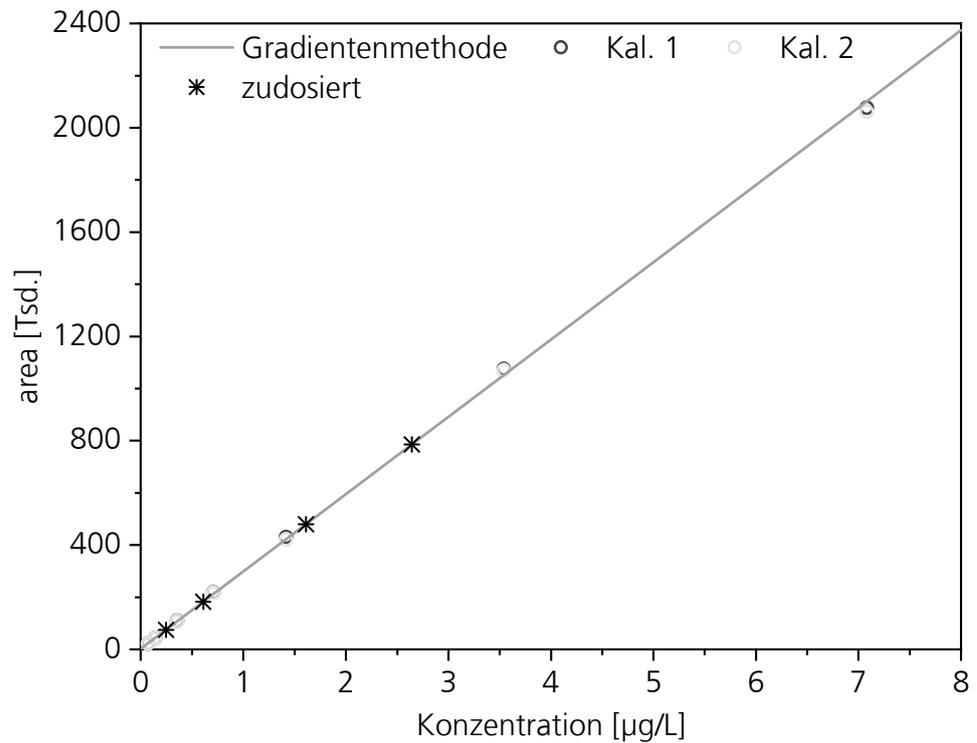


Bild 89:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Chlor-2-methylanilin (A11).

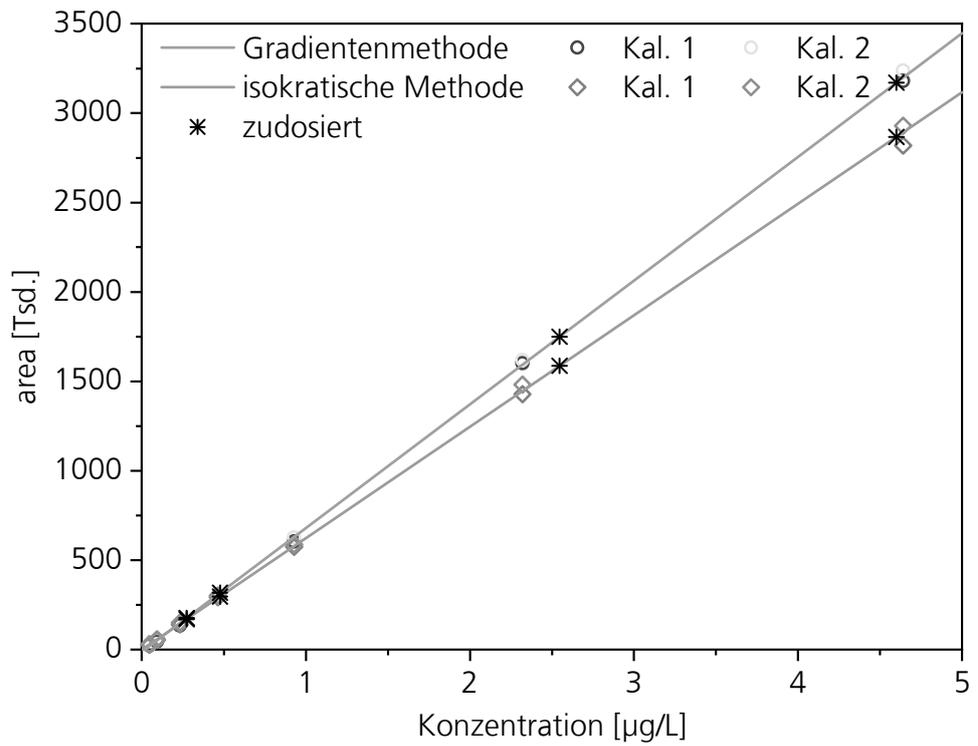


Bild 90:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2-Naphthylamin (A13).

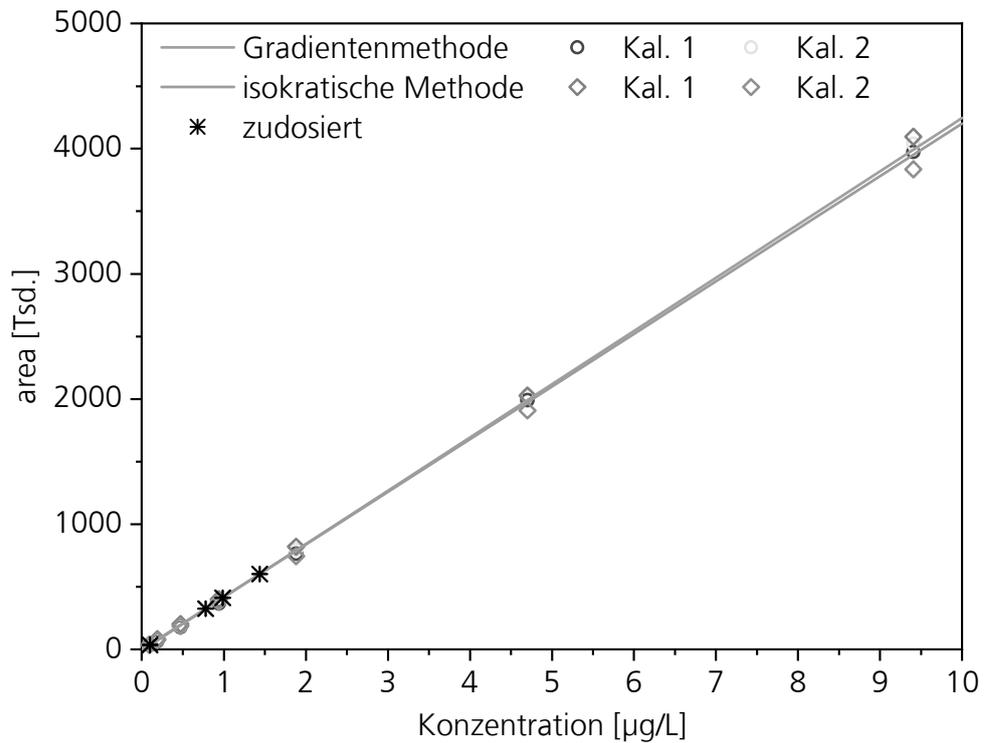


Bild 91:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Aminobiphenyl (A14).

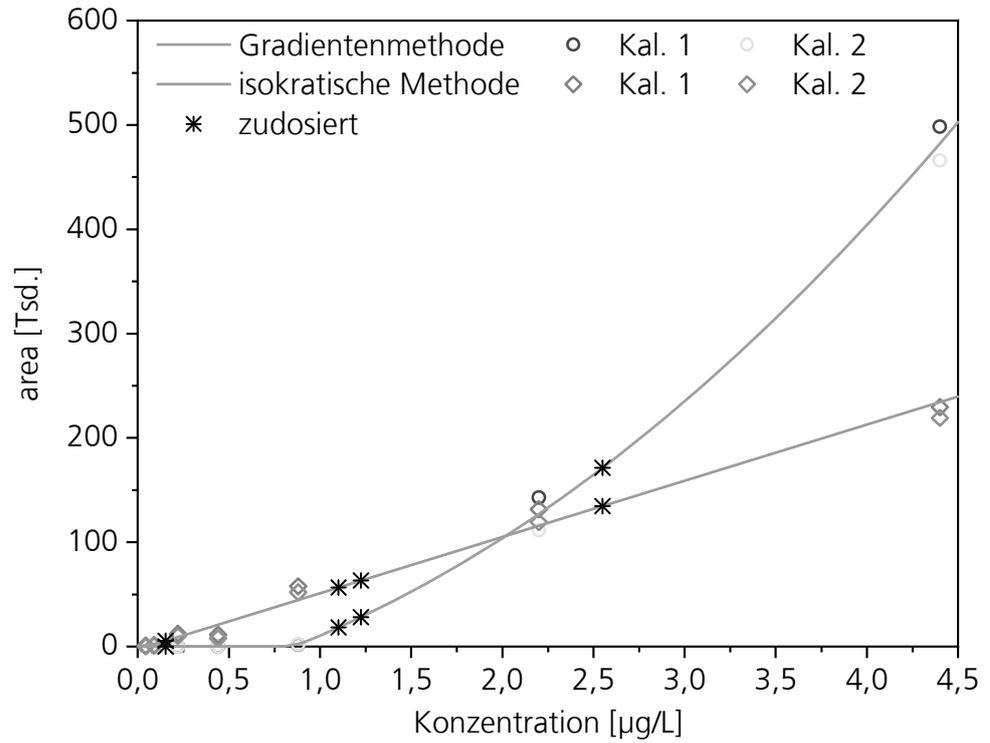


Bild 92:  
UPLC-MS/MS- Kalibrierkurve (quadratisch) für Benzidin (A15).

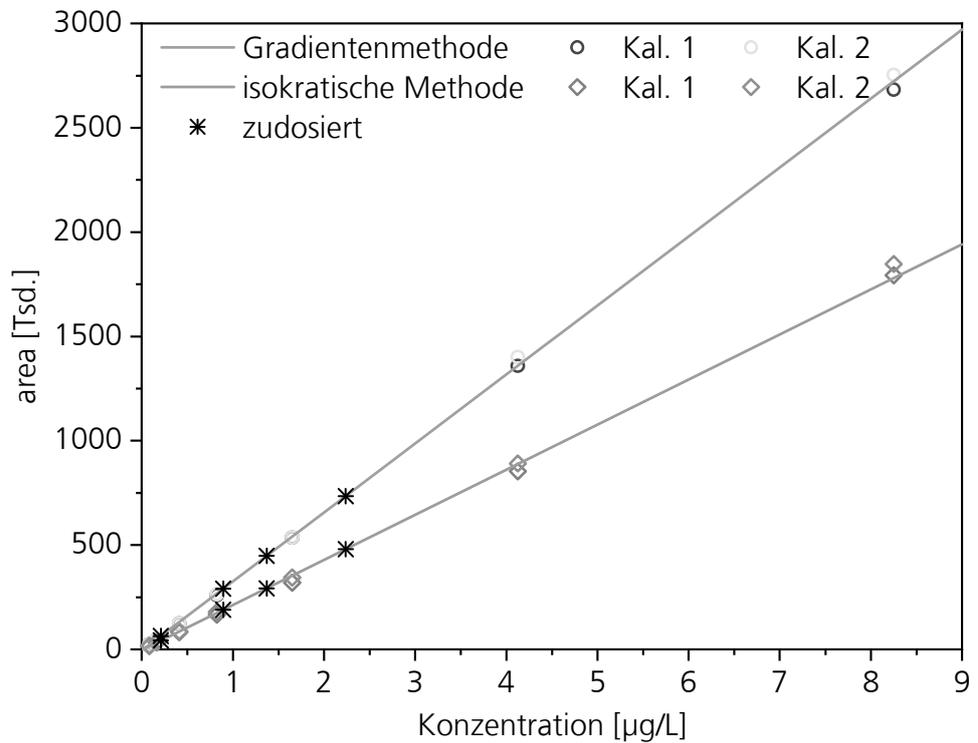


Bild 93:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-MDA (A16).

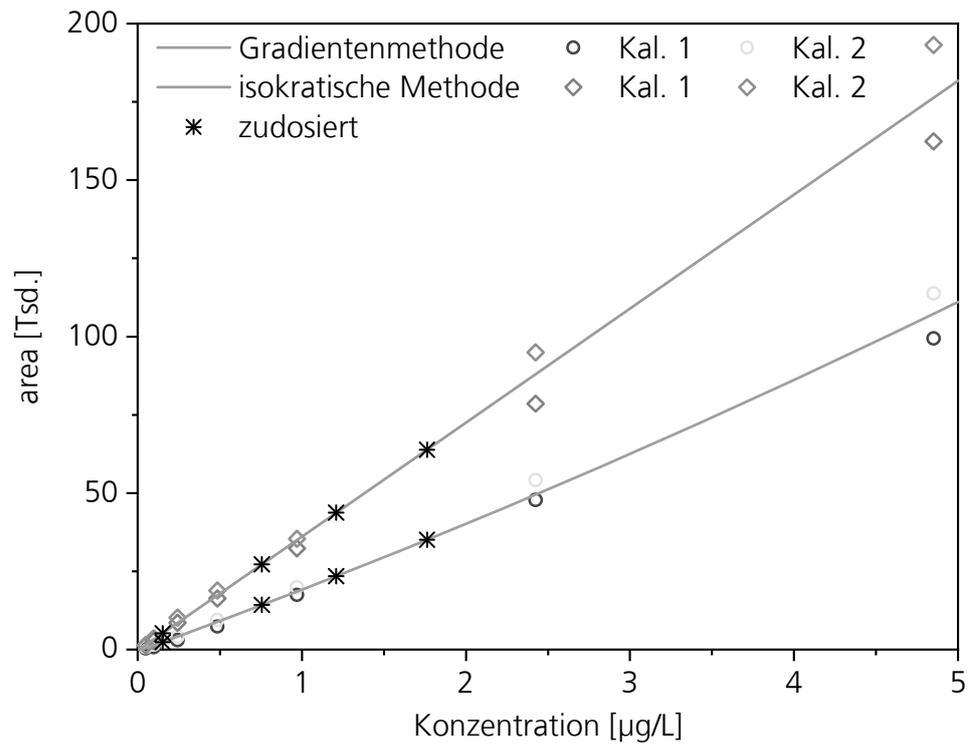


Bild 94: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-Oxydianilin (A17).

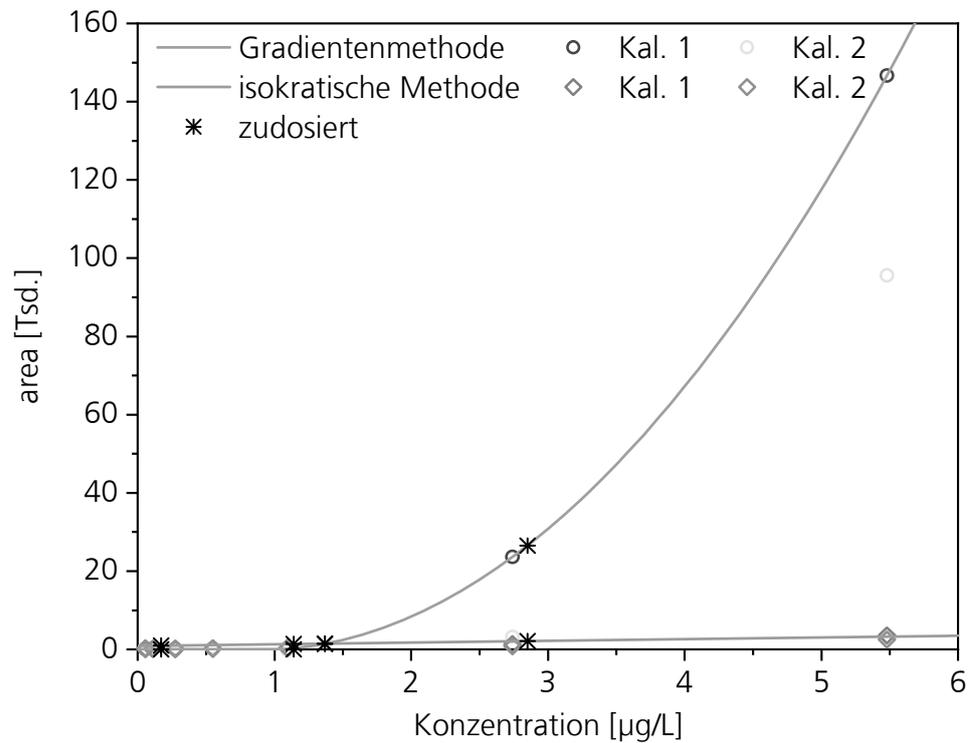


Bild 95: UPLC-MS/MS- Kalibrierkurve (quadratisch) für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

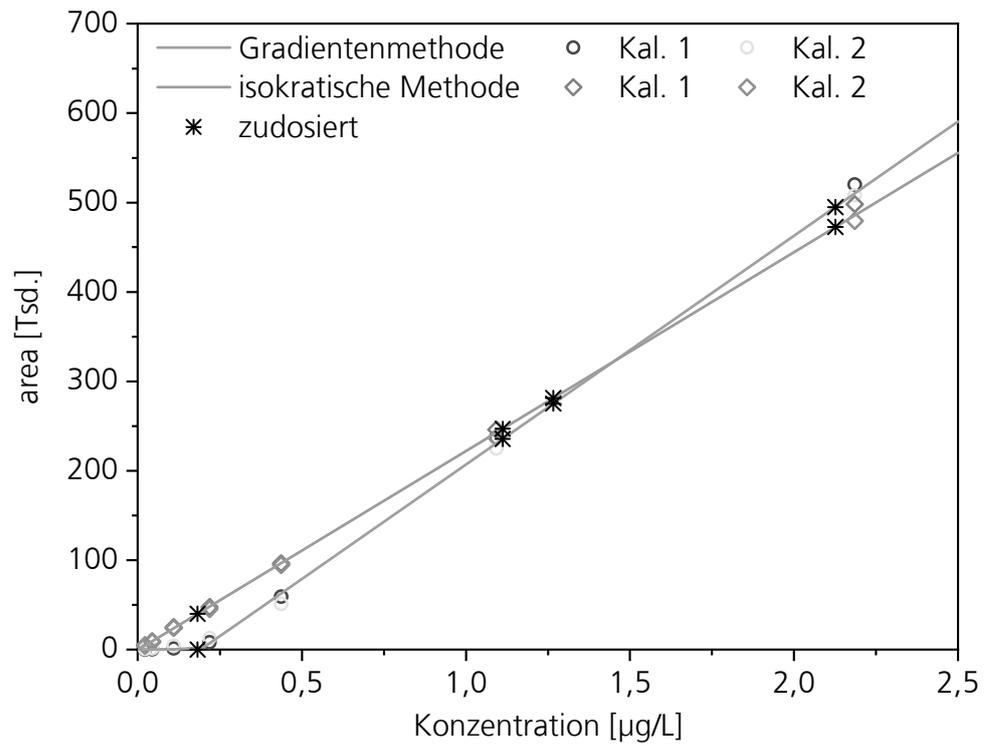


Bild 96:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-Thiodianilin (A19).

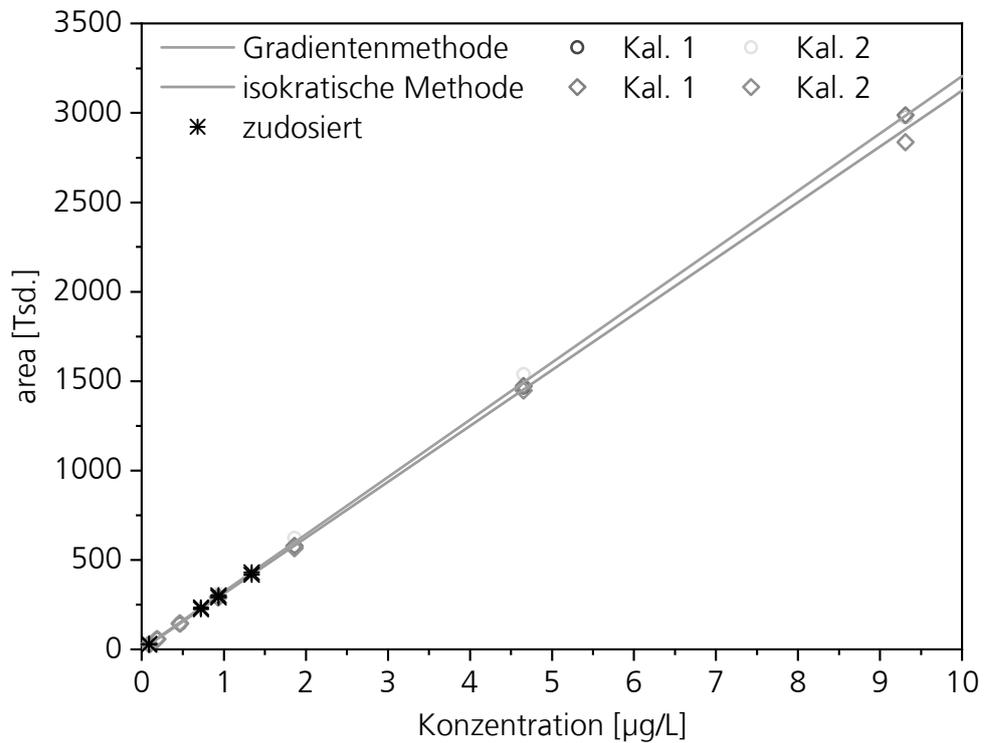


Bild 97:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für o-Aminoazotoluol (A20).

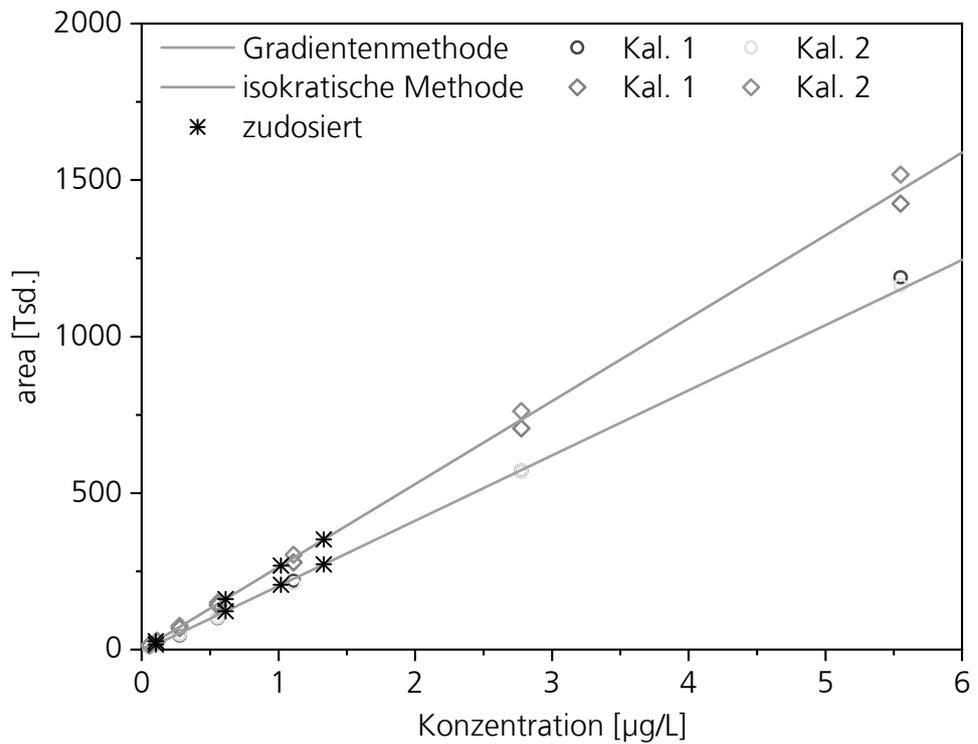


Bild 98:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21).

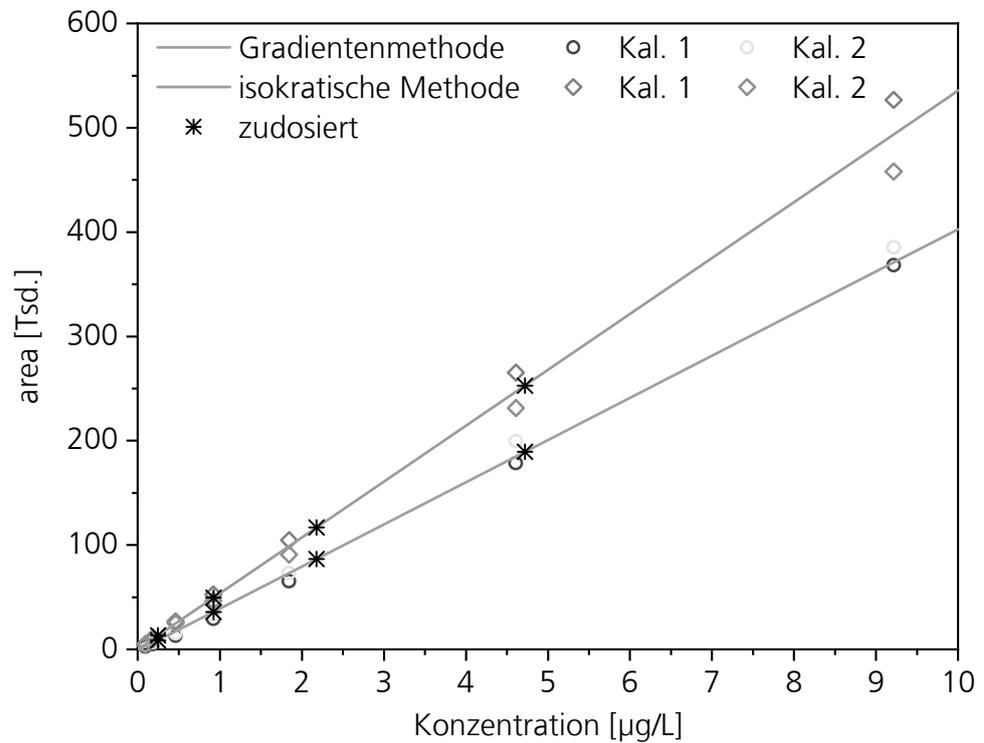


Bild 99:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 3,3'-Dichlorbenzidin (A22).

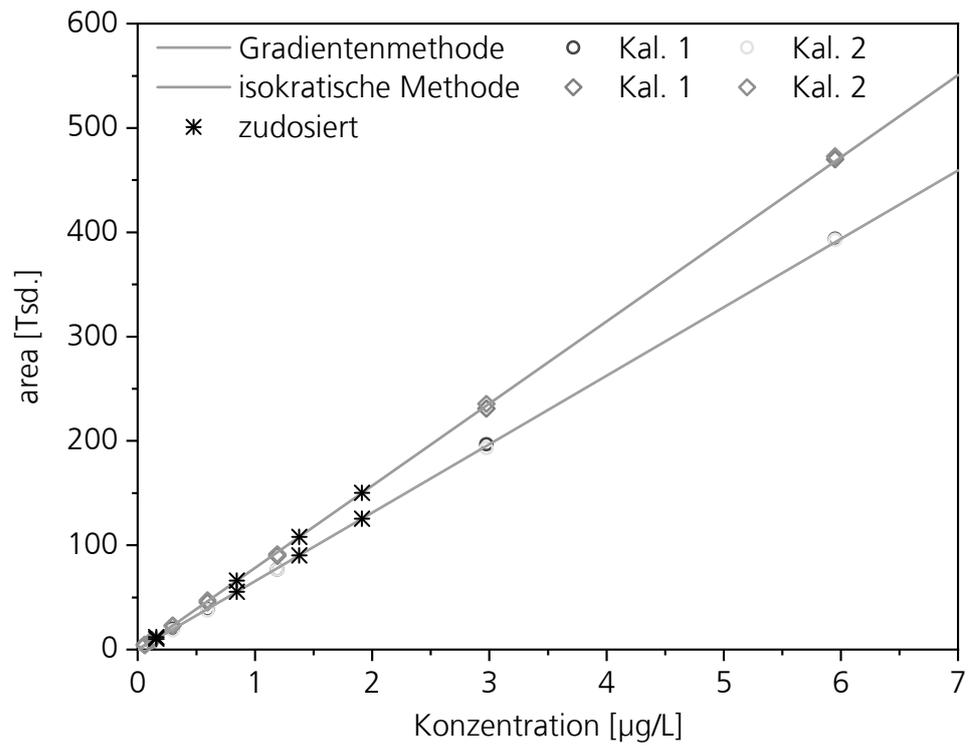


Bild 100:  
UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23).

## A.5 Anhang 5: Methodenvergleich (Amine einzeln)

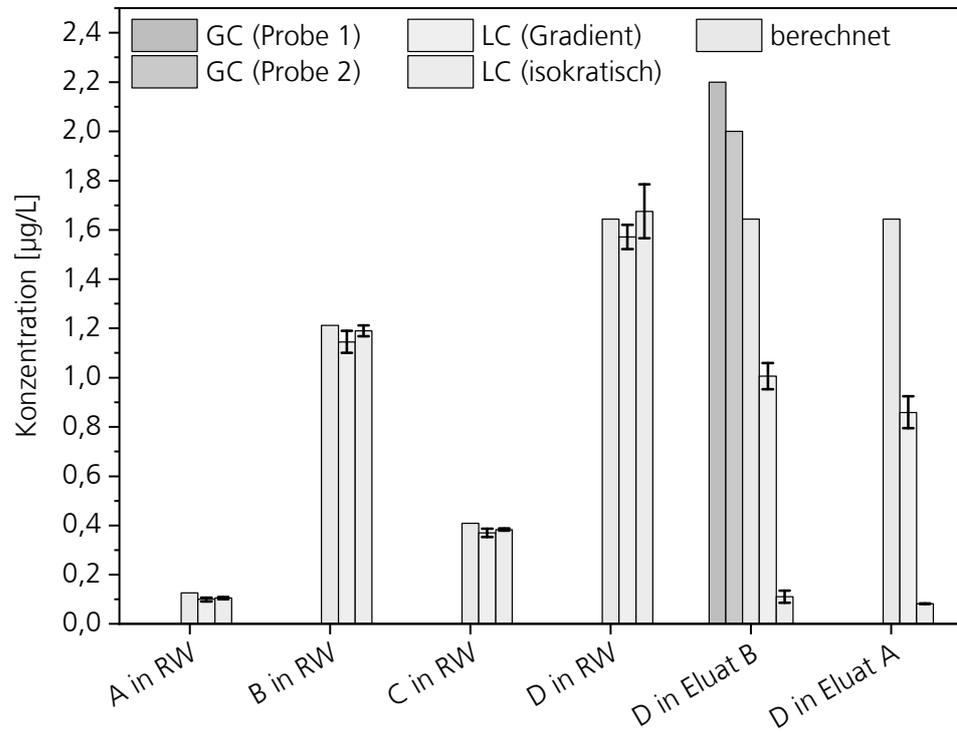


Bild 101:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für o-Toluidin (A01).

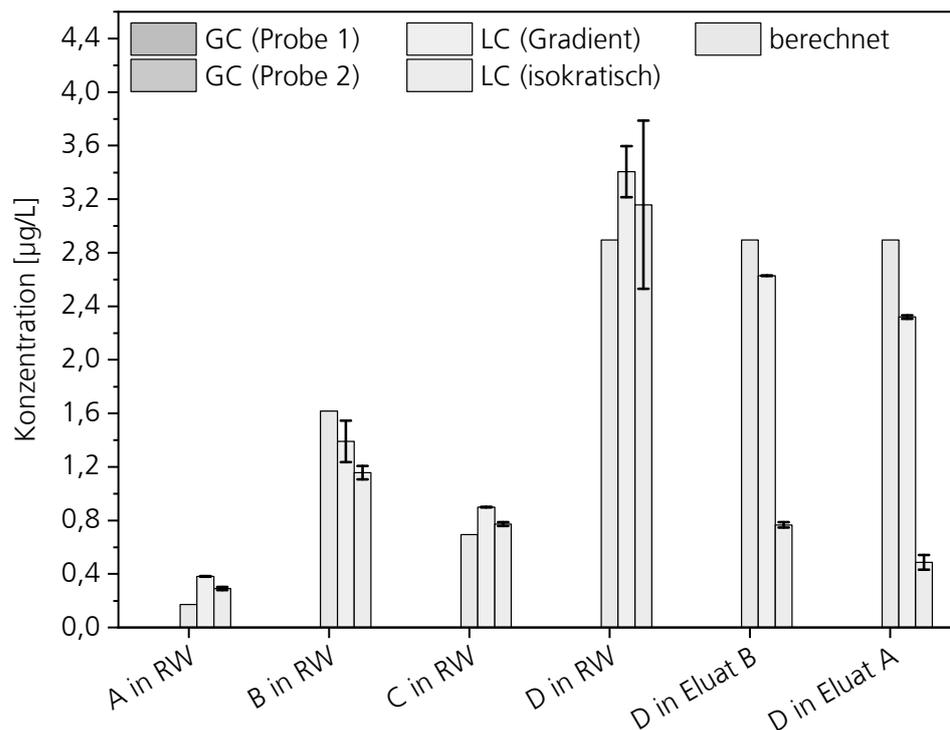


Bild 102:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4-TDA (A04).

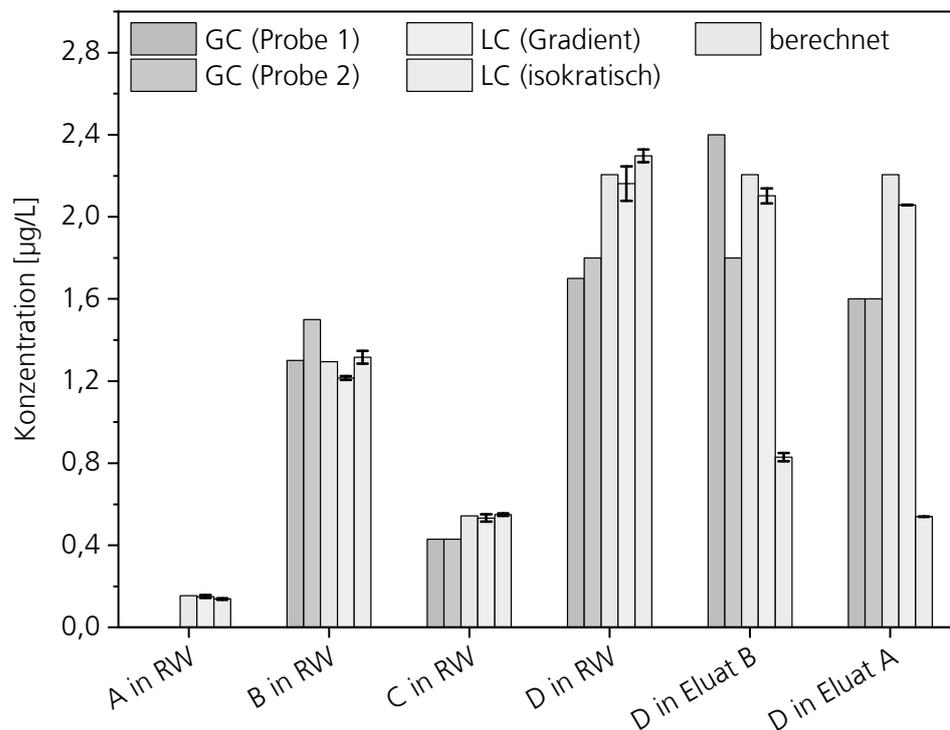


Bild 103:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Chloranilin (A06).

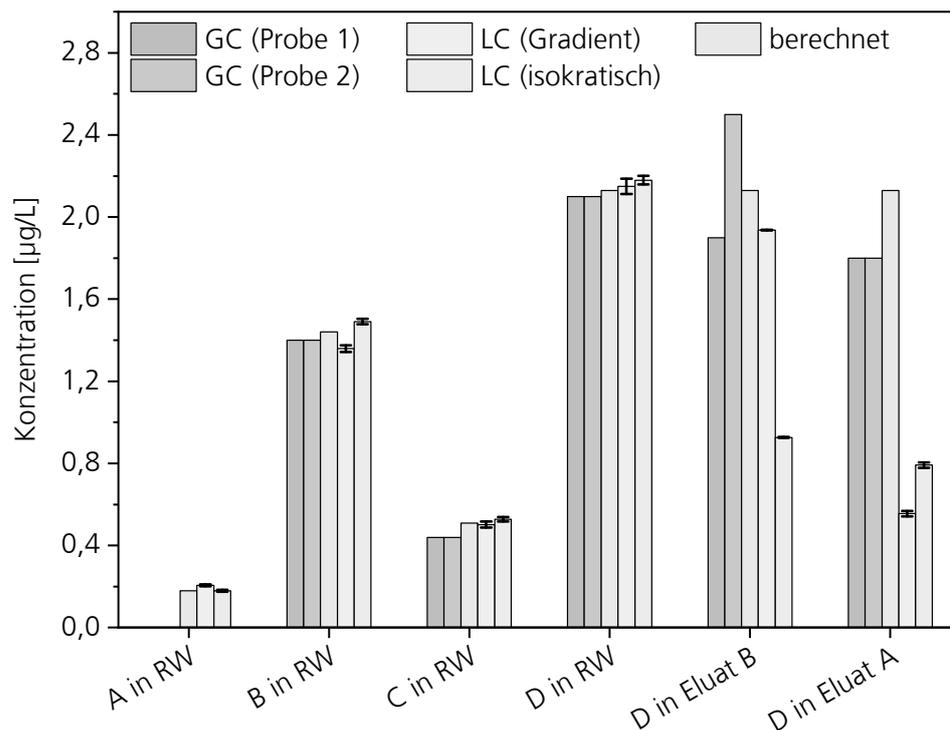


Bild 104: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4,5-Trimethylanilin (A07).

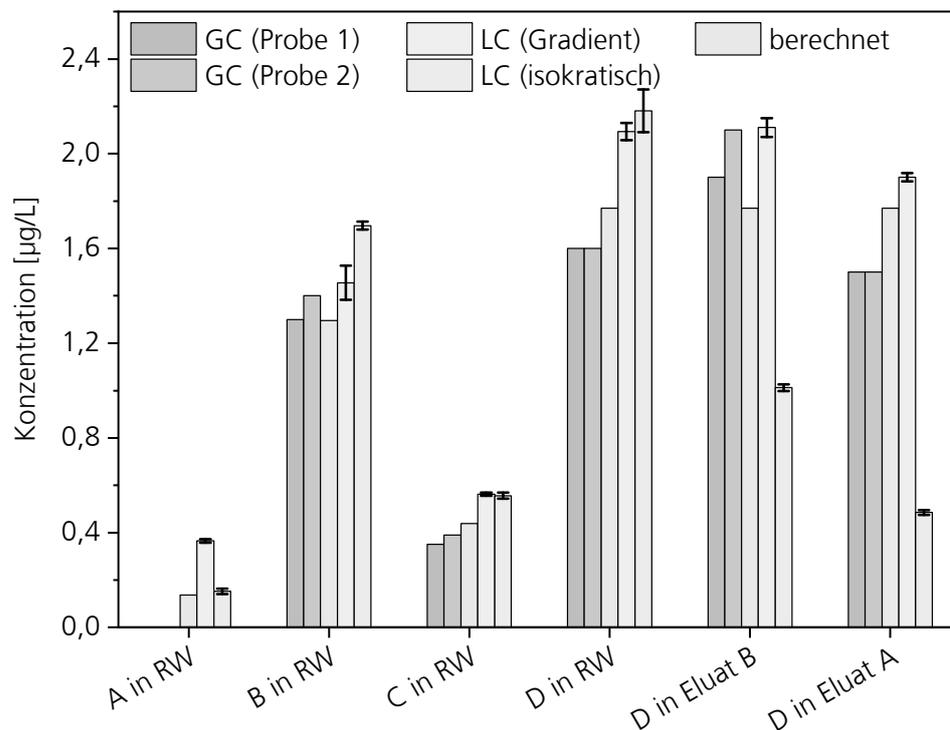


Bild 105: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für p-Kresidin (A08).

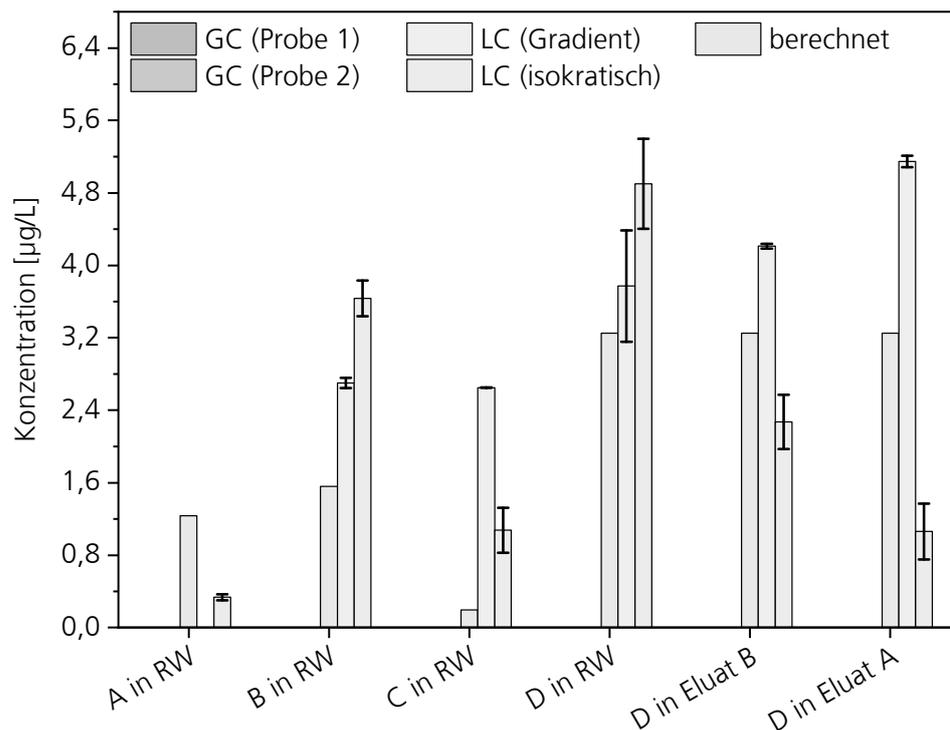


Bild 106:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4-Diaminoanisole (A09).

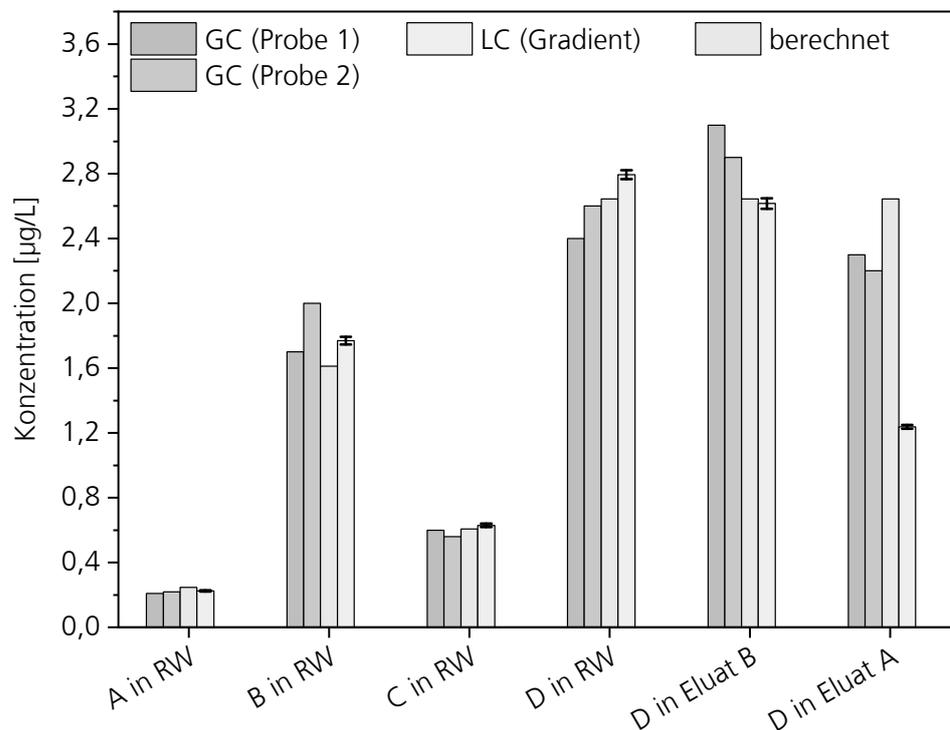


Bild 107:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Chlor-2-methylanilin (A11).

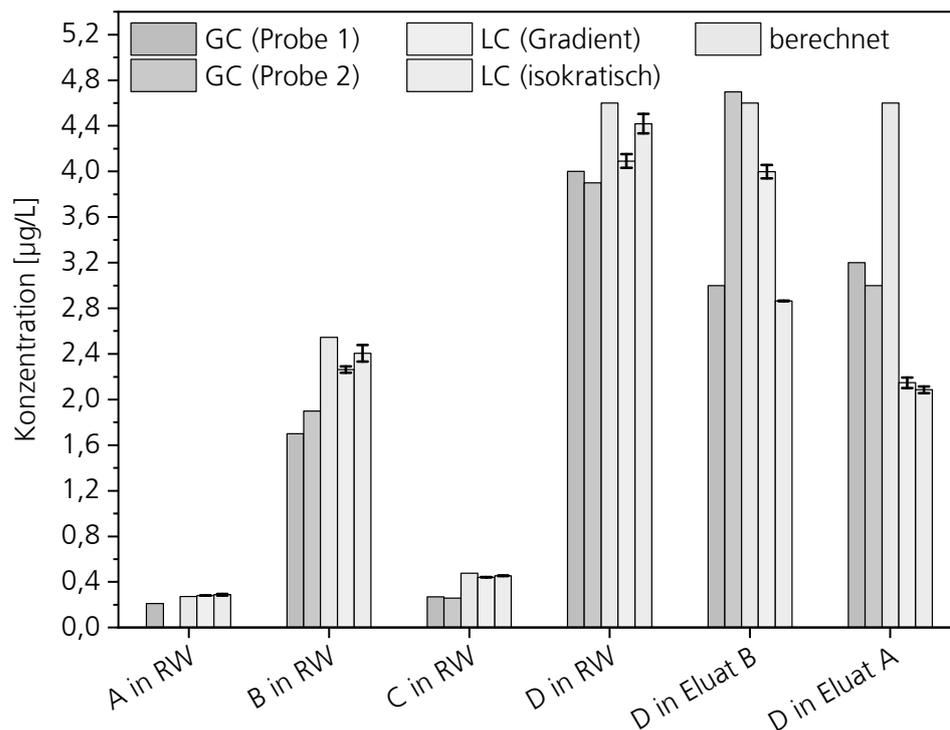


Bild 108:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2-Naphthylamin (A13).

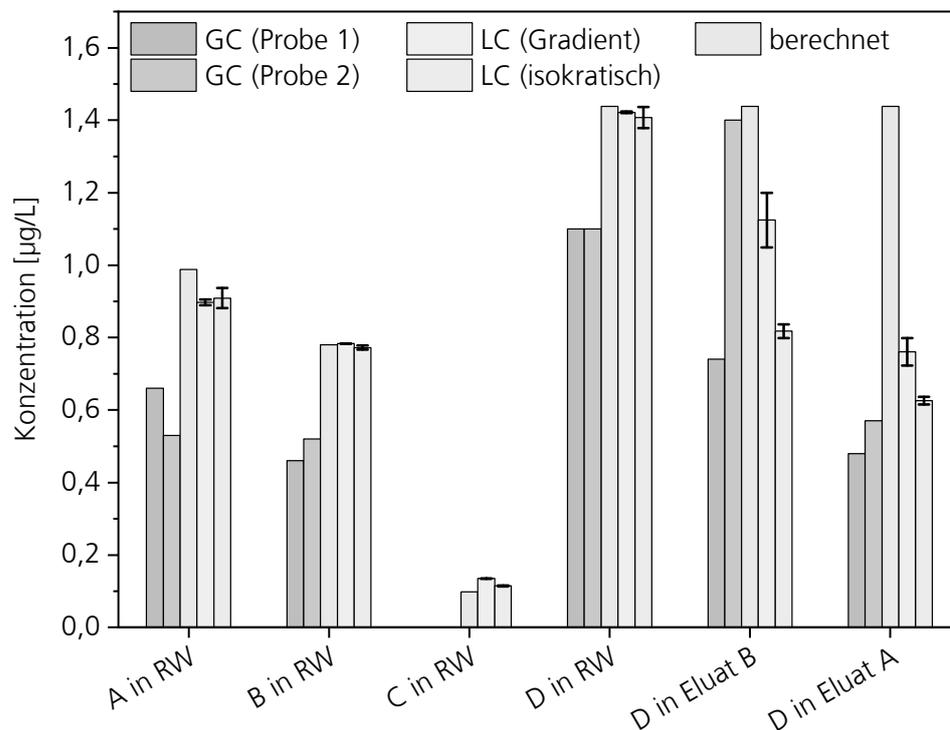


Bild 109:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Aminobiphenyl (A14).

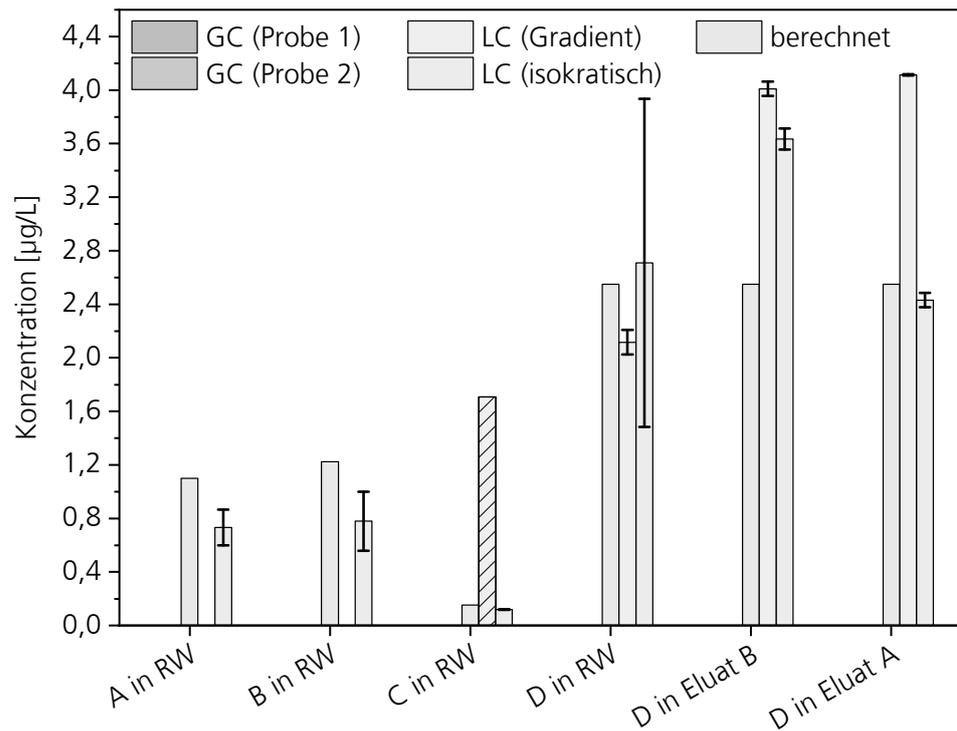


Bild 110:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für Benzidin (A15).

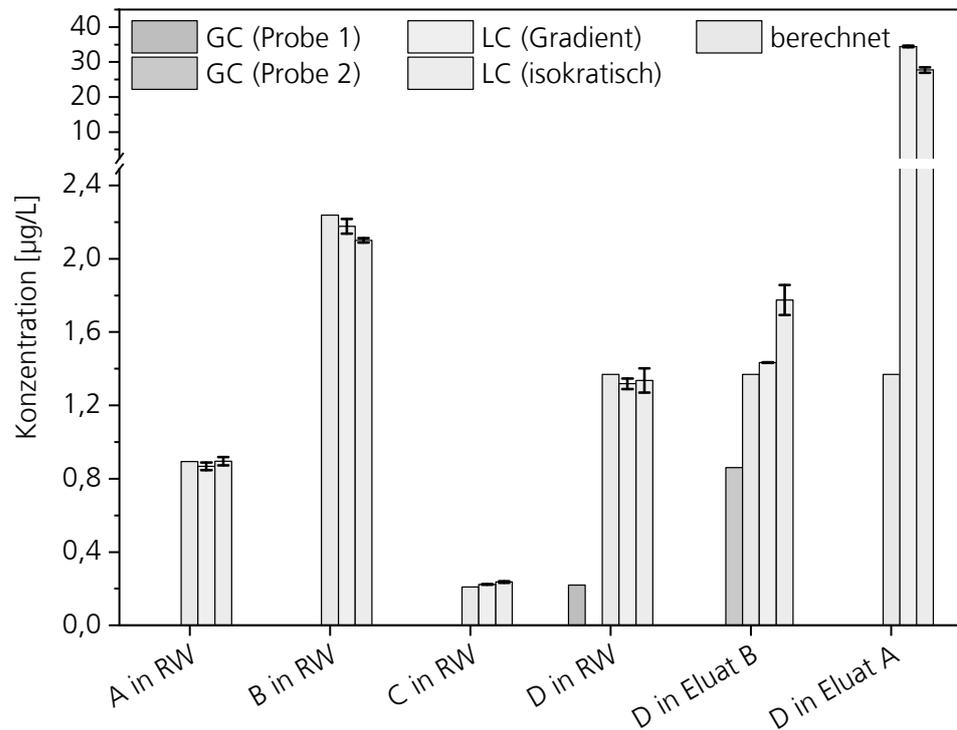


Bild 111:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-MDA (A16).

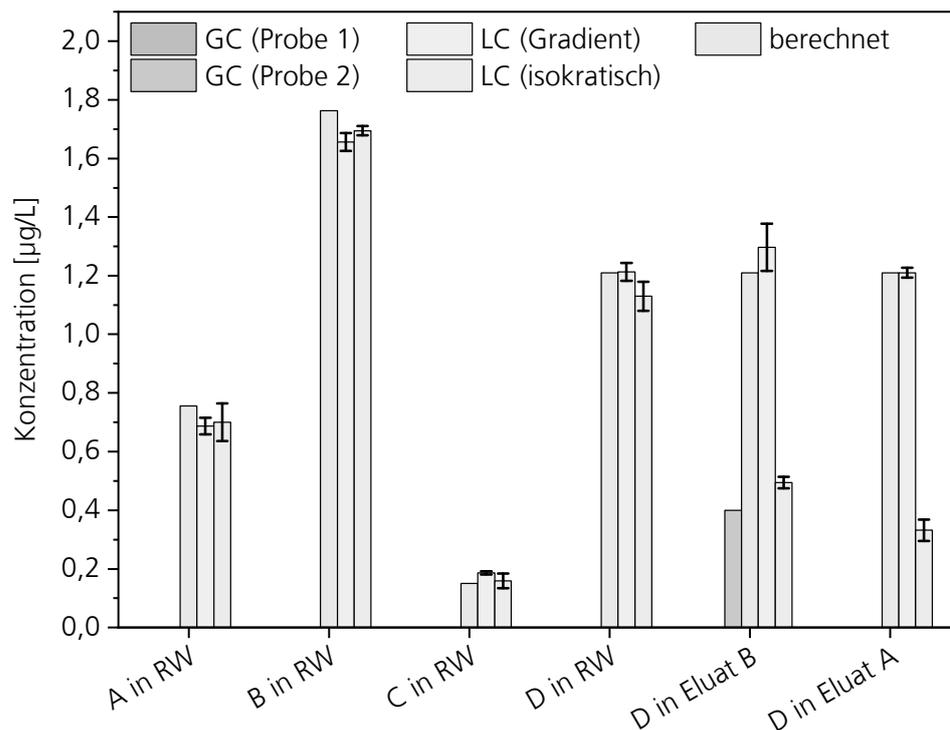


Bild 112:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-Oxydianilin (A17).

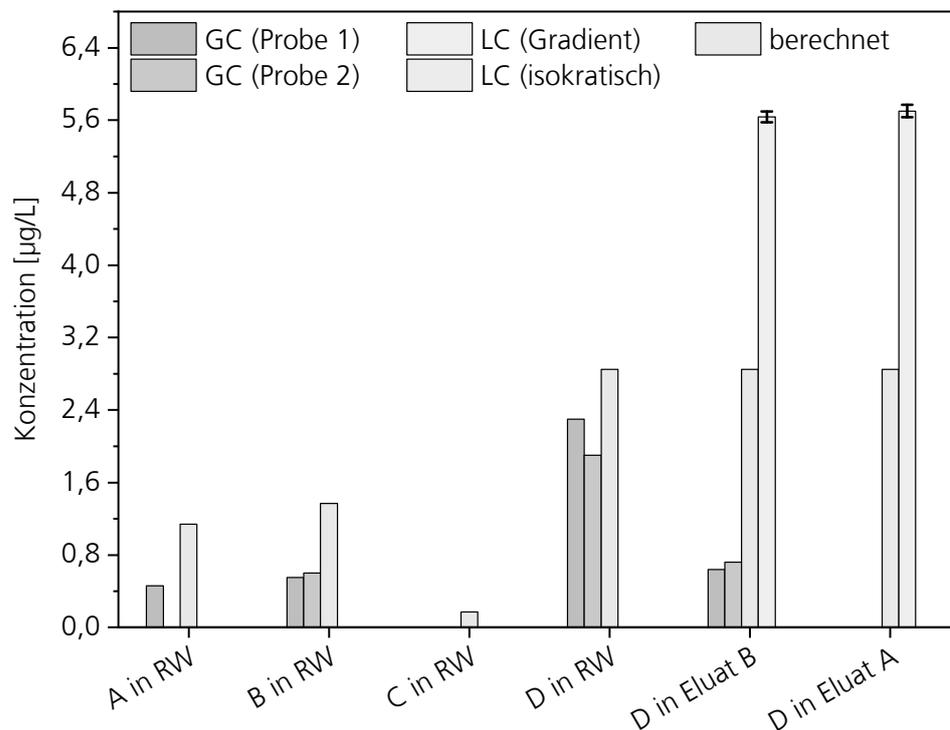


Bild 113:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).

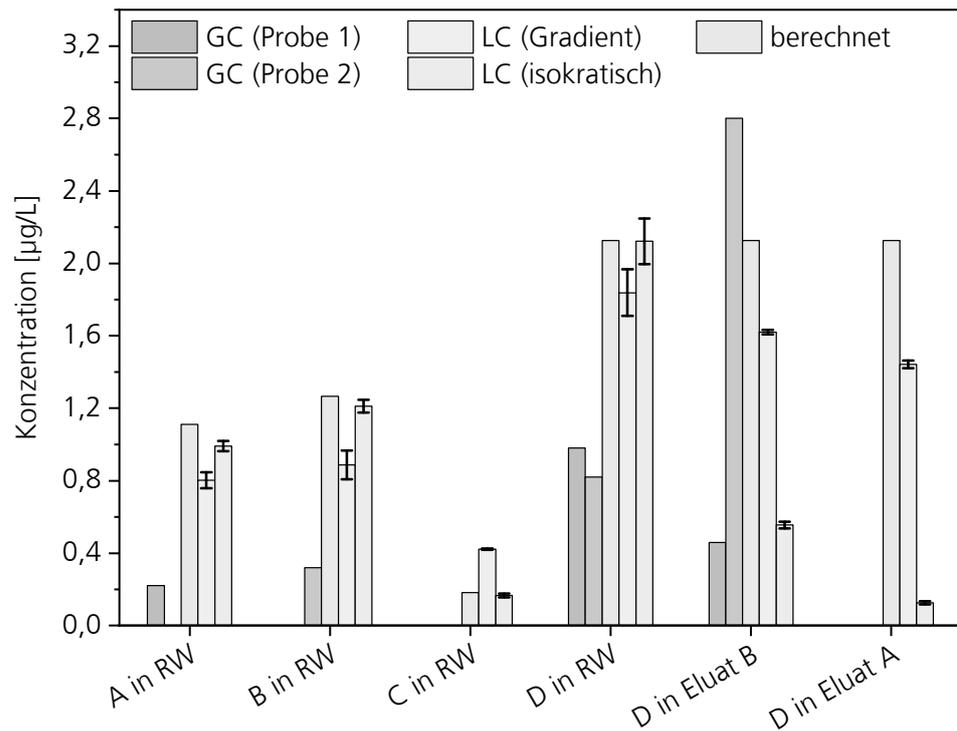


Bild 114:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-Thiodianilin (A19).

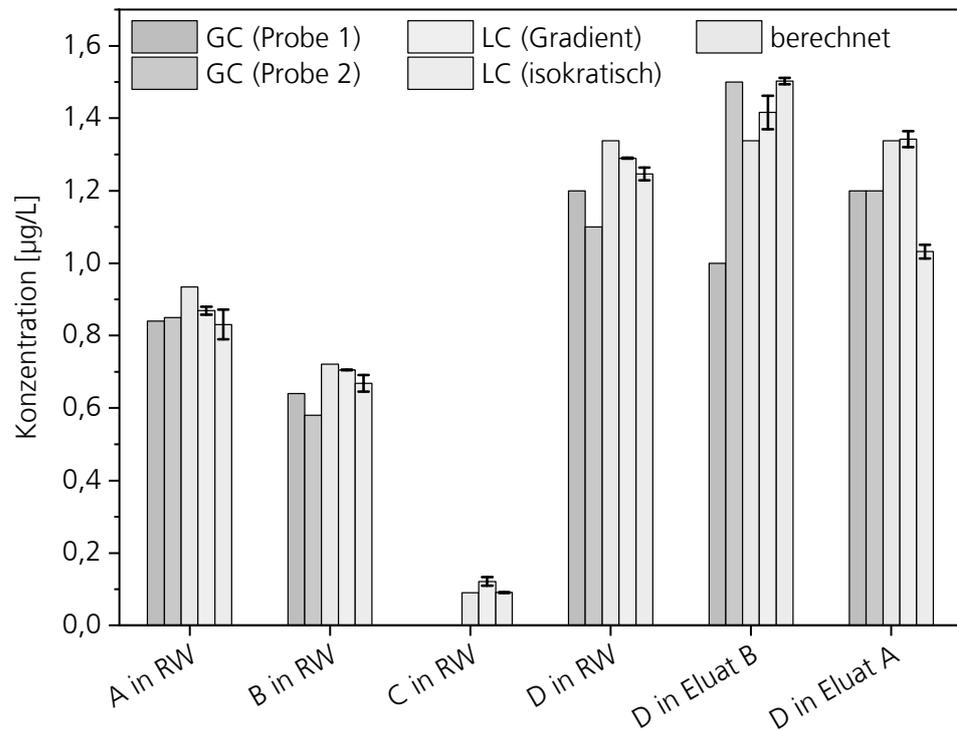


Bild 115:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für o-Aminoazotoluol (A20).

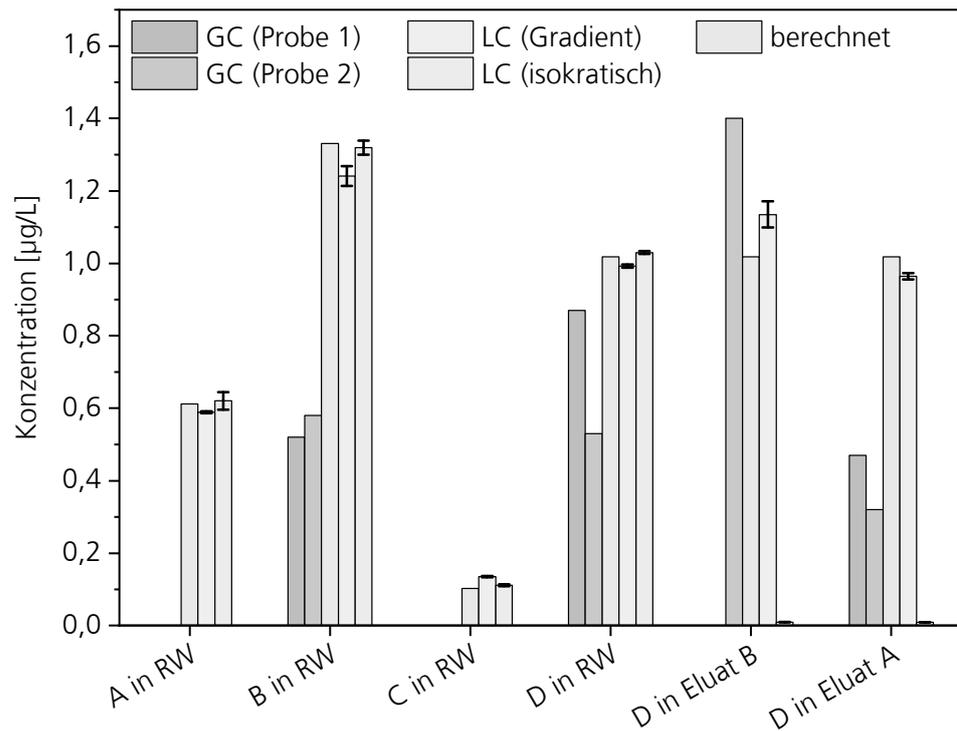


Bild 116:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21).

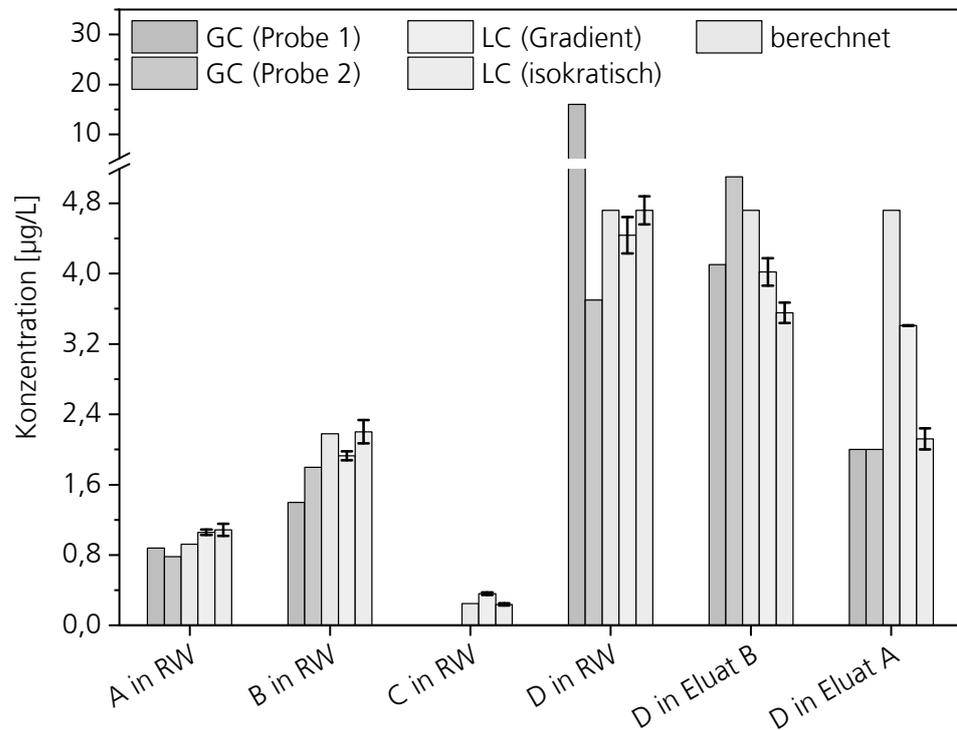


Bild 117:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 3,3'-Dichlorbenzidin (A22).

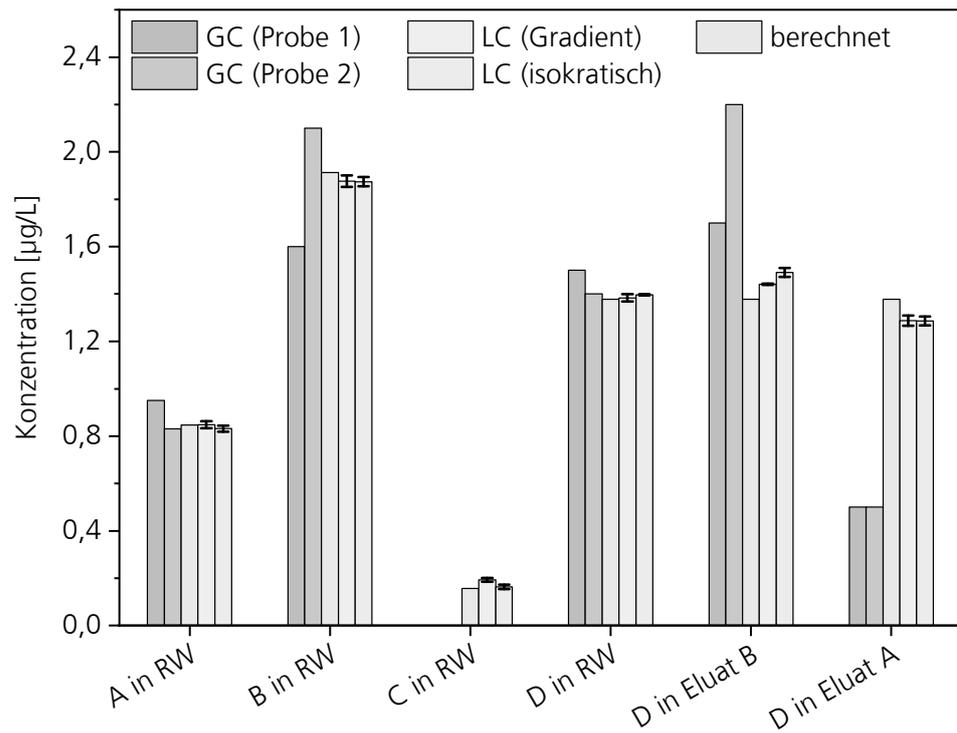


Bild 118:  
Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23).

## A.6 Anhang 6: Vergleich angesäuertes vs. neutrales Eluat aus Projektphase II

Vergleich mit Untersuchungsergebnissen von Harz-Eluat aus der Projektphase II [9]: In Bild 119 sind die Verläufe für 4,4'-MDA und 2,4'-MDA gezeigt. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe für die angesäuerten und die nicht angesäuerten Fraktionsproben sind qualitativ identisch und die Konzentrationen sind quantitativ in ähnlicher Höhe. Die Konzentrationen in den neutralen Proben sind 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.

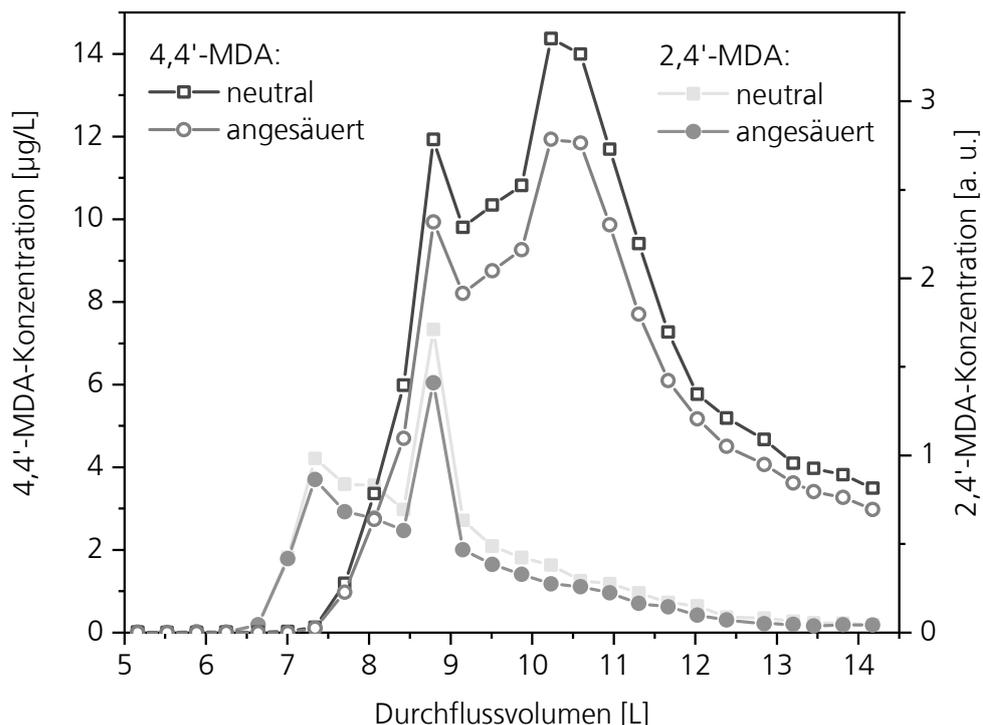


Bild 119:

Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A 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.

## A.7 Anhang 7: Während des Forschungsvorhabens verwendete Verfahrensbeschreibung

### 1 Vorbereitung

#### 1.1 Lösungsmittelmischungen und verdünnte Säuren

##### 1.1.1 Verdünnte Ameisensäure

Zu 80 ml Reinstwasser werden 20 ml Ameisensäure gegeben.

Die 1:5 verdünnte Ameisensäure enthält ca. 5,3  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  Ameisensäure.

Die verdünnte Ameisensäure kann bei 6 °C im Kühlschrank gelagert werden.

##### 1.1.2 Laufmittel A und B

###### Laufmittel A

Acetonitril mit 0,02 Vol.-% Ameisensäure

Zu 2,5 l Acetonitril werden 500  $\mu\text{l}$  Ameisensäure zugegeben.

###### Laufmittel B

Reinstwasser mit 0,02 Vol.-% Ameisensäure

Zu 2,5 l Reinstwasser werden 500  $\mu\text{l}$  Ameisensäure zugegeben.

##### 1.1.3 Mischung A, B und C

###### Mischung A

Die Mischung A wird für das Ansetzen der Stammlösungen eingesetzt.

Mischung A entspricht im Wesentlichen der Zusammensetzung des Laufmittels der isokratischen UPLC-Methode; der höhere Gehalt an Ameisensäure wird benötigt, um die basischen Amine zu neutralisieren und um die Löslichkeit zu steigern.

Mischung A:

160 mL Acetonitril / 300 mL Reinstwasser / 250  $\mu\text{L}$  Ameisensäure

=> ergibt ca. 460 mL zum Ansetzen der Stammlösungen

###### Mischung B

Die Mischung B wird zum Verdünnen bei den Verdünnungsreihen für die Kalibrierung des Analysenverfahrens mit der Gradienten-Methode verwendet.

Mischung B entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels zu Beginn der Gradienten-Methode.

Mischung B:  
32 mL Acetonitril / 425 mL Reinstwasser / 90 µL Ameisensäure  
=> ergibt ca. 457 mL

#### Mischung C

Die Mischung C wird zum Verdünnen bei den Verdünnungsreihen für die Kalibrierung des Analysenverfahrens mit der isokratischen Methode verwendet.

Mischung C entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels der isokratischen UPLC-Methode.

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

### **1.1.4 Mischung Sg, Si, Ng und Ni**

#### Mischung Sg

Die Mischung Sg wird einer bereits bei der Probenahme angesäuerten Wasserprobe vor der instrumentellen Analyse mit der Gradienten-Methode im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Mischung Sg:  
70 mL Acetonitril / 430 mL Reinstwasser  
=> ergibt ca. 500 mL

Die 1:1-Mischung der gemäß Ziffer 2.2 angesäuerten Wasserprobe mit Mischung Sg entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels zu Beginn der Gradienten-Methode.

#### Mischung Si

Die Mischung Si wird einer bereits bei der Probenahme angesäuerten Wasserprobe vor der instrumentellen Analyse mit der isokratischen UPLC-Methode im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Mischung Si:  
350 mL Acetonitril / 150 mL Reinstwasser  
=> ergibt ca. 500 mL

Die 1:1-Mischung der gemäß Ziffer 2.2 angesäuerten Wasserprobe mit Mischung Si entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels bei der isokratischen UPLC-Methode.

### Mischung Ng

Die Mischung Ng wird einer neutralen Wasserprobe vor der instrumentellen Analyse mit der Gradienten-Methode im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Mischung Ng:

70 mL Acetonitril / 430 mL Reinstwasser / 200 µL Ameisensäure

=> ergibt ca. 500 mL

Die 1:1-Mischung der Wasserprobe mit Mischung Ng entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels zu Beginn der Gradienten-Methode.

### Mischung Ni

Die Mischung Ni wird einer neutralen Wasserprobe vor der instrumentellen Analyse mit der isokratischen UPLC-Methode im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Mischung Ni:

350 mL Acetonitril / 150 mL Reinstwasser / 200 µL Ameisensäure

=> ergibt ca. 500 mL

Die 1:1-Mischung der Wasserprobe mit Mischung Ni entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels bei der isokratischen UPLC-Methode.

## 1.2 Ansetzen der Stammlösungen

Die Stammlösungen werden in Mischung A angesetzt. Die Einwaagen und Zielkonzentrationen sind in Tabelle 1 bis Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 1:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S1. Lösungsmittel: Mischung A.

<b>Amin Nr.</b>	<b>Amin</b>	<b>Einwaage Amin [mg]</b>	<b>Messkolben [ml]</b>	<b>Konz. Amin [ng/µl]</b>
A14	4-Aminobiphenyl	10	50	200
A19	4,4'-Thiodianilin	10		200
A20	o-Aminoazotoluol	10		200
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	10		200

Tabelle 2:  
Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S2. Lösungsmittel: Mischung A.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A01	o-Toluidin	10	50	200
A07	2,4,5-Trimethylanilin	10		200
A08	p-Kresidin	10		200
A11	4-Chlor-2-methylanilin	10		200

Tabelle 3:  
Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S3. Lösungsmittel: Mischung A.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A16	4,4'-MDA	10	50	200
A17	4,4'-Oxydianilin	10		200
A21	3,3'-Dimethyl-4,4'-MDA	10		200
A23	3,3'-Dichlor-4,4'-MDA	10		200

Tabelle 4:  
Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S4. Lösungsmittel: Mischung A.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A03	p-Toluidin	10	50	200
A04	2,4-TDA	10		200
A06	4-Chloranilin	10		200
A13	2-Naphthylamin	10		200

Tabelle 5:  
Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S5. Lösungsmittel: Mischung A.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A09	2,4-Diaminoanisol	10	50	200
A15	Benzidin	10		200
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	10		200

Tabelle 6:  
Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S6. Lösungsmittel: Mischung A.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A03	m-Toluidin	10	50	200
A05	2,6-TDA	10		200
A10	3-Chlor-2-methylanilin	10		200
A12	1-Naphthylamin	10		200

### 1.3 Verdünnungsreihen für die Kalibrierung

Die Lösung V1 wird durch Mischen und Verdünnen der sechs Stammlösungen S1 bis S6 hergestellt (Tabelle 7). Die Analyt-Konzentrationen in der Lösung V1 können aus der Nominal-Konzentration der Lösung V1 (und aller weiteren daraus hergestellten Verdünnungen) durch Multiplizieren mit dem entsprechenden, in Tabelle 8 aufgelisteten Faktor berechnet werden.

Anschließend wird die Lösung V1 um den Faktor 500 verdünnt. Die bei der Verdünnung mit Mischung B entstehende Lösung wird V2g genannt (Tabelle 9), diese wird für die Kalibrierung der Gradienten-Methode benötigt. Bei der Verdünnung mit Mischung C wird die Lösung V2i erhalten (Tabelle 10), welche für die Kalibrierung der Gradienten-Methode benötigt wird. Die Kalibrierlösungen für die Analysenverfahren mit Gradienten-Methode und isokratischer Methode werden in 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss durch Verdünnen mit Mischung B (Tabelle 11) bzw. Mischung C (Tabelle 12) hergestellt.

Tabelle 7:

Herstellung der Lösung V1 aus den Stammlösungen S1 bis S4 durch Verdünnung in einem 10 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung C.

Quelle	Amin	$C_s$ [ng/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{V1}$ [pg/ $\mu$ l]
S1	4-Aminobiphenyl	200	25	500
	4,4'-Thiodianilin	200		500
	o-Aminoazotoluol	200		500
	3,3'-Dichlorbenzidin	200		500
S2	o-Toluidin	200	25	500
	2,4,5-Trimethylanilin	200		500
	p-Kresidin	200		500
	4-Chlor-2-methylanilin	200		500
S3	4,4'-MDA	200	25	500
	4,4'-Oxydianilin	200		500
	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	200		500
	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	200		500
S4	p-Toluidin	200	25	500
	2,4-TDA	200		500
	4-Chloranilin	200		500
	2-Naphthylamin	200		500
S5	2,4-Diaminoanisol	200	100	2.000
	Benzidin	200		2.000
	3,3'-Dimethylbenzidin	200		2.000
S6	m-Toluidin	200	15	300
	2,6-TDA	200		300
	3-Chlor-2-methylanilin	200		300
	1-Naphthylamin	200		300

Tabelle 8:

Faktor zur Berechnung einer Analyt-Konzentration in der Kalibrierlösung aus der jeweiligen Nominal-Konzentration.

<b>Amin Nr.</b>	<b>Amin</b>	<b>Faktor</b>
--	Nominal-Konzentration	1
A01	o-Toluidin	1
A02	m-Toluidin	0,6
A03	p-Toluidin	1
A04	2,4-TDA	1
A05	2,6-TDA	0,6
A06	4-Chloranilin	1
A07	2,4,5-Trimethylanilin	1
A0	p-Kresidin	1
A09	2,4-Diaminoanisol	4
A10	3-Chlor-2-methylanilin	0,6
A11	4-Chlor-2-methylanilin	1
A12	1-Naphthylamin	0,6
A13	2-Naphthylamin	1
A14	4-Aminobiphenyl	1
A15	Benzidin	4
A16	4,4'-MDA	1
A17	4,4'-Oxydianilin	1
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	4
A19	4,4'-Thiodianilin	1
A20	o-Aminoazotoluol	1
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	1
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	1
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	1

Tabelle 9:

Herstellung der Lösung V2g für die Gradienten-Methode aus der Lösung V1 durch Verdünnung um Faktor 1000 in einem 20 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung **B**.

Quelle	Amin	$C_{V1}$ [ng/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{V2g}$ [pg/ $\mu$ l]
V1	o-Toluidin	500	20	0,5
	m-Toluidin	300		0,3
	p-Toluidin	500		0,5
	2,4-TDA	500		0,5
	2,6-TDA	300		0,3
	4-Chloranilin	500		0,5
	2,4,5-Trimethylanilin	500		0,5
	p-Kresidin	500		0,5
	2,4-Diaminoanisol	2.000		2,0
	3-Chlor-2-methylanilin	300		0,3
	4-Chlor-2-methylanilin	500		0,5
	1-Naphthylamin	300		0,3
	2-Naphthylamin	500		0,5
	4-Aminobiphenyl	500		0,5
	Benzidin	2.000		2,0
	4,4'-MDA	500		0,5
	4,4'-Oxydianilin	500		0,5
	3,3'-Dimethylbenzidin	2.000		2,0
	4,4'-Thiodianilin	500		0,5
	o-Aminoazotoluol	500		0,5
	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	500		0,5
	3,3'-Dichlorbenzidin	500		0,5
	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	500		0,5

Tabelle 10:

Herstellung der Lösung V2i für die Gradienten-Methode aus der Lösungen V1 durch Verdünnung um Faktor 1000 in einem 20 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung **C**.

Quelle	Amin	$C_{V1}$ [ng/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{V2i}$ [pg/ $\mu$ l]
V1	o-Toluidin	500	20	0,5
	m-Toluidin	300		0,3
	p-Toluidin	500		0,5
	2,4-TDA	500		0,5
	2,6-TDA	300		0,3
	4-Chloranilin	500		0,5
	2,4,5-Trimethylanilin	500		0,5
	p-Kresidin	500		0,5
	2,4-Diaminoanisol	2.000		2,0
	3-Chlor-2-methylanilin	300		0,3
	4-Chlor-2-methylanilin	500		0,5
	1-Naphthylamin	300		0,3
	2-Naphthylamin	500		0,5
	4-Aminobiphenyl	500		0,5
	Benzidin	2.000		2,0
	4,4'-MDA	500		0,5
	4,4'-Oxydianilin	500		0,5
	3,3'-Dimethylbenzidin	2.000		2,0
	4,4'-Thiodianilin	500		0,5
	o-Aminoazotoluol	500		0,5
2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	500	0,5		
3,3'-Dichlorbenzidin	500	0,5		
2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	500	0,5		

Die Kalibrierreihen für die beiden chromatographischen Methoden werden in 1,5 ml Vials mit Crimpverschluss angesetzt. Die zuzugebenden Volumina sind in Tabelle 11 (für die Gradienten-Methode) bzw. Tabelle 12 (für die isokratische Methode) angegeben, das Lösungsmittel ist wieder an das Laufmittel der jeweiligen chromatographischen Methode anzupassen.

Tabelle 11:

Empfohlene Verdünnungen für die Kalibrierung des Verfahrens mit Gradienten-Methode. Lösungsmittel: Mischung **B**.

Bez.	Vol. Mischung B [µl]	Konz. V2g [pg/µl]		Vol. V2g [µl]	Ges.-vol. [µl]	Konz. [pg/µl]	
		nom.	max.			nom.	max.
Kg005	990	0,5	2,0	10	1.000	0,005	0,020
Kg010	980			20	1.000	0,010	0,040
Kg015	970			30	1.000	0,015	0,060
Kg020	960			40	1.000	0,020	0,080
Kg025	950			50	1.000	0,025	0,100
Kg050	900			100	1.000	0,050	0,200
Kg075	850			150	1.000	0,075	0,300
<b>Kg100</b>	800			200	1.000	0,100	0,400
Kg125	750			250	1.000	0,125	0,500
Kg200	600			400	1.000	0,200	0,800
Kg300	400			600	1.000	0,300	1,200
Kg400	200			800	1.000	0,400	1,600
Kg500	0			1.000	1.000	0,500	2,000

= wird für die grobe Kalibrierung eingesetzt  
(7-Punkt-Kalibrierung)

**Kg100** = wird auch für die Qualitätssicherung (QC) eingesetzt

Tabelle 12:

Empfohlene Verdünnungen für die Kalibrierung des Verfahrens mit isokratischer Methode. Lösungsmittel: Mischung C.

Bez.	Vol. Mischung C [µl]	Konz. V2i [pg/µl]		Vol. V2i [µl]	Ges.-vol. [µl]	Konz. [pg/µl]	
		nom.	max.			nom.	max.
Ki005	990	0,5	2,0	10	1.000	0,005	0,020
Ki010	980			20	1.000	0,010	0,040
Ki015	970			30	1.000	0,015	0,060
Ki020	960			40	1.000	0,020	0,080
Ki025	950			50	1.000	0,025	0,100
Ki050	900			100	1.000	0,050	0,200
Ki075	850			150	1.000	0,075	0,300
<b>Ki100</b>	800			200	1.000	0,100	0,400
Ki125	750			250	1.000	0,125	0,500
Ki200	600			400	1.000	0,200	0,800
Ki300	400			600	1.000	0,300	1,200
Ki400	200			800	1.000	0,400	1,600
Ki500	0			1.000	1.000	0,500	2,000

= wird für die grobe Kalibrierung eingesetzt (7-Punkt-Kalibrierung)

**Ki100** = wird auch für die Qualitätssicherung (QC) eingesetzt

#### 1.4 Lösung SA

Für die Matrixtests und das ggf. notwendige Standardadditionsverfahren wird die „Lösung SA“ eingesetzt (Tabelle 13). Die Lösung SA enthält nominal 6 pg/µl Amin. Eine Zudosierung von 20 µl Lösung SA zu 600 µl Probe entspricht bei einem Gesamtvolumen von 1200 µl einer zudosierten nominalen Konzentration von 0,1 µg/l im Vial bzw. von 0,2 µg/L im Eluat.

Tabelle 13:

Herstellung der Lösung SA aus der Lösung V1 durch Verdünnung in einem 5 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung C.

Quelle	Amin	$C_{V1}$ [pg/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{SA}$ [pg/ $\mu$ l]
	Nominal-Konzentration	500	60	6
V1	o-Toluidin	500	60	6
	m-Toluidin	300		3,6
	p-Toluidin	500		6
	2,4-TDA	500		6
	2,6-TDA	300		3,6
	4-Chloranilin	500		6
	2,4,5-Trimethylanilin	500		6
	p-Kresidin	500		6
	2,4-Diaminoanisol	2.000		24
	3-Chlor-2-methylanilin	300		3,6
	4-Chlor-2-methylanilin	500		6
	1-Naphthylamin	300		3,6
	2-Naphthylamin	500		6
	4-Aminobiphenyl	500		6
	Benzidin	2.000		24
	4,4'-MDA	500		6
	4,4'-Oxydianilin	500		6
	3,3'-Dimethylbenzidin	2.000		24
	4,4'-Thiodianilin	500		6
	o-Aminoazotoluol	500		6
2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	500	6		
3,3'-Dichlorbenzidin	500	6		
2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	500	6		

## 2 Durchführung

### 2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Um den Einfluss von Abbau (ggf. Konzentrationsabnahme im neutralen Milieu) und Hydrolyse (ggf. Konzentrationszunahme im sauren Milieu) zu erfassen, werden von jeder Wasserprobe (ggf. jeder Elutionsfraktion) zwei Proben abgefüllt und nur eine der beiden abgefüllten Proben wird angesäuert.

In Tabelle 14 sind systematische Kurzbezeichnungen für mögliche Analysen bzw. Untersuchungen je Wasserprobe bzw. Elutionsfraktion aufgelistet. Die in dieser Verfahrensbeschreibung (Anhang A7) in Ziffer 2 näher beschriebenen Analysen bzw. Untersuchungen sind in Tabelle 14 fett gedruckt und in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 14:  
Systematische Benennung der Proben für die Instrumentelle Analytik.

Art der Analyse	Standard-addition	UPLC-Methode	Neutrale Probe	Angesäuerte Probe
Vortest	nein	Gradient	<b>nVg</b>	<b>sVg</b>
		isokratisch	nVi	sVi
Matrixtest	ja (1 Konz.)	Gradient	nMg	<b>sMg</b>
		isokratisch	nMi	<b>sMi</b>
Spurenanalyse	nein	Gradient	<b>nSg</b>	<b>sSg</b>
		isokratisch	<b>nSi</b>	<b>sSi</b>
Standard-additions-Verfahren	ja (6 Konz.)	Gradient	nA1g	<b>sA1g</b>
			nA2g	<b>sA2g</b>
			nA3g	<b>sA3g</b>
			nA4g	<b>sA4g</b>
			nA5g	<b>sA5g</b>
			nA6g	<b>sA6g</b>
		isokratisch	nA1i	sA1i
			nA2i	sA2i
			nA3i	sA3i
			nA4i	sA4i
			nA5i	sA5i
			nA6i	sA6i

Da in Elutionsfraktionen insbesondere 4,4'-MDA gelegentlich in sehr hohen Konzentrationen (> 10 µg/l) enthalten ist, sind Vortests mit hoher Verdünnung

angeraten (Bezeichnung „nVg“ und „sVg“, Verdünnung 1:100). Treten hohe Konzentrationen eines analysierten Amins auf, so ist das Massenspektrometer bei den anschließenden Analysen mit geringer verdünnten Proben (1:2-Verdünnung) für die zugehörige Masse blind zu schalten. Bei Trinkwasserproben oder anderen Wasserproben, bei denen bekannt ist, dass sie keine Analyt-Konzentrationen über 2 µg/l enthalten, kann der Vortest weggelassen werden.

Aufgrund der möglichen Beeinflussung der Elektrospray-Ionisation durch bei der Chromatographie co-eluierende Matrixbestandteile ist es für die Spurenanalyse geboten, für beide chromatographische Methoden jeweils eine „Matrixtest“-Probe (sMg und sMi) zu untersuchen.

Wenn die beim Matrixtest ermittelte Konzentration über der zudosierten Konzentration liegt oder dieser entspricht, gibt es keine Hinweise auf Signalsuppression und die „Spurenanalyse“ (Tabelle 12; nSg, nSi, sSg, sSi) kann für die neutrale und die angesäuerte Wasserprobe sowie mit beiden UPLC-Methoden durchgeführt werden.

Wenn für Wasserproben bzw. Elutionsfraktionen die beim Matrixtest ermittelten Konzentrationen um mehr als 20 % unter der zudosierten Konzentration liegen, dann ist für diese Elutionsfraktion ein Standardadditionsverfahren bzw. DIN 32633:2013-05 [12] mit sechs äquidistanten zudosierten Konzentrationen anzuwenden.

Tabelle 15:

In der Regel für die Instrumentelle Analytik zu verwendende, präparierte Proben mit zugehöriger Benennung.

<b>Art der Analyse</b>	<b>Standard-addition</b>	<b>UPLC-Methode</b>	<b>Neutrale Probe</b>	<b>Angesäuerte Probe</b>
Vortest	nein	Gradient	<b>nVg</b>	<b>sVg</b>
Matrixtest	ja (1 Konz.)	Gradient		<b>sMg</b>
		isokratisch		<b>sMi</b>
Spurenanalyse	nein	Gradient	<b>nSg</b>	<b>sSg</b>
		isokratisch	<b>nSi</b>	<b>sSi</b>
Standard-additions-Verfahren (falls notwendig)	ja (6 Konz.)	Gradient		<b>sA1g</b>
				<b>sA2g</b>
				<b>sA3g</b>
				<b>sA4g</b>
				<b>sA5g</b>
				<b>sA6g</b>

## 2.2 Durchführung der Probenahme

An der Probenahmestelle werden für jede Wasserprobe bzw. Elutionsfraktion jeweils mindestens zwei 4 ml Schraubdeckelglasgefäße mit einer eindeutig zuordenbaren Proben- und Fraktionsnummer sowie eine mit dem Code „n“ und eine mit dem Code „s“ beschriftet.

**„n“-Probe** = neutrale Probe:

Für die neutralen Proben werden ca. 4 ml Wasserprobe in ein 4 ml Schraubdeckelglas abgefüllt. (Ein exaktes Volumen ist hier nicht erforderlich.)

**„s“-Probe** = angesäuerte Probe:

Für die angesäuerten Proben werden mit einer 5 ml Messpipette 4000 µl Wasserprobe in ein 4 ml Schraubdeckelglas abgefüllt, anschließend werden 10 µl 1:5-verdünnte Ameisensäure zugegeben.

## 2.3 Filtrierung der Proben

Die Probelösungen sind vor der Verdünnung mit hPTFE-Filtern zu filtrieren. Die Filter sind zunächst mit 2 mL der jeweiligen Probe zu spülen. Die filtrierten Proben werden in ein beschriftetes 4 ml Schraubdeckelglas abgefüllt.

## 2.4 Probenvorbereitung für den Vortest (V)

Für den Vortest auf hohe Konzentrationen z. B. an 4,4'-MDA werden für jede Wasserprobe zwei 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. Die zwei Vials werden mit der laborinternen Probennummer, ggf. der Fraktionsnummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- nVg entspricht der neutralen Probe mit der Gradienten-Methode
- sVg entspricht der angesäuerten Probe mit der Gradienten-Methode

In beide Vials werden 1485 µl Mischung **B** vorgelegt.

Anschließend werden mit einer 100 µl Messpipette 15 µl Wasserprobe aus den 4 ml Schraubdeckelgläsern überführt:

- aus dem Gefäß mit dem Code „n“ in das Vial mit dem Code „nVg“
- aus dem Gefäß mit dem Code „s“ in das Vial mit dem Code „sVg“

Die Vials werden jeweils mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

**Achtung:**

Im Anschluss an die Auswertung der Vortest-Sequenz muss entschieden werden, ob das MS/MS aufgrund von hohen Analyt-Konzentrationen ( $> 10 \mu\text{g/l}$  in der Ausgangsprobe) für bestimmte Massenübergänge in der anschließenden Spurenanalysen-Sequenz blind geschaltet werden muss. Dies kann beispielsweise bei 4,4'-MDA gehäuft auftreten.

## 2.5 Probenvorbereitung für den Matrixtest (M)

Für jede Wasserprobe werden zwei 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. Die zwei Vials werden mit der laborinternen Probennummer, ggf. der Fraktionsnummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- sMg entspricht der angesäuerten Probe mit der Gradienten-Methode
- sMi entspricht der angesäuerten Probe mit der isokratischen Methode

In beide Vials werden jeweils 600  $\mu\text{l}$  aus dem 4 ml Schraubdeckelglas mit dem Code „s“ vorgelegt.

Danach werden mit einer 1000  $\mu\text{l}$  Messpipette

- in das Vial mit dem Code „sMg“ 580  $\mu\text{l}$  der Mischung Sg
- und
- in das Vial mit dem Code „sMi“ 580  $\mu\text{l}$  der Mischung Si

zudosiert.

Anschließend werden mit einer 100  $\mu\text{l}$  Messpipette in beide Vials jeweils 20  $\mu\text{l}$  der Mischung SA (Tabelle 13) zugegeben.

Die Vials werden jeweils mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

## 2.6 Probenvorbereitung für die Spurenanalyse (S)

Für jede Wasserprobe werden vier 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. Die vier Vials werden mit der laborinternen Probennummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- nSg entspricht der neutralen Probe mit der Gradienten-Methode
- nSi entspricht der neutralen Probe mit der isokratischen Methode
- sSg entspricht der angesäuerten Probe mit der Gradienten-Methode

- sSi entspricht der angesäuerten Probe mit der isokratischen Methode

Mit einer 1000 µl Messpipette werden aus den 4 ml Schraubdeckelgläsern jeweils 600 µl in die Vials überführt, und zwar:

- aus dem Gefäß mit dem Code „n“ in die beiden Vials mit dem Code „nSg“ und „nSi“
- aus dem Gefäß mit dem Code „s“ in die beiden Vials mit dem Code „sSg“ und „sSi“

Anschließend werden mit einer 1000 µl Messpipette:

- in das Vial mit dem Code „nSg“ 600 µl der Mischung Ng,
- in das Vial mit dem Code „nSi“ 600 µl der Mischung Ni,
- in das Vial mit dem Code „sSg“ 600 µl der Mischung Sg, und
- in das Vial mit dem Code „sSi“ 600 µl der Mischung Si

zudosiert.

Die Vials werden mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

## 2.7 Standardadditionsverfahren (A)

Für jede Wasserprobe werden sechs 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. Die sechs Vials werden mit der laborinternen Probennummer, ggf. der Fraktionsnummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- sA1g entspricht 0,15 pg/µl im Eluat
- sA2g entspricht 0,30 pg/µl im Eluat
- sA3g entspricht 0,45 pg/µl im Eluat
- sA4g entspricht 0,60 pg/µl im Eluat
- sA5g entspricht 0,75 pg/µl im Eluat
- sA6g entspricht 0,90 pg/µl im Eluat

In alle 6 Vials werden jeweils 600 µl aus dem 4 ml Schraubdeckelglas mit dem Code „s“ vorgelegt.

Danach wird in die 6 Vials die Mischung Sg mit einer 1000 µl Messpipette und die Mischung SA mit einer 100 µl Messpipette zudosiert. Die Volumina sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16:

Zuzudosierende Volumina für das Standardadditionsverfahren nach DIN 32633 [12].

Vial	Mischung Sg	Mischung SA	Eluat	Gesamt-volumen	Konz.* [pg/µl]
sA1g	585 µl	15 µl	600 µl	1200 µl	0,15
sA2g	570 µl	30 µl			0,30
sA3g	555 µl	45 µl			0,45
sA4g	540 µl	60 µl			0,60
sA5g	525 µl	75 µl			0,75
sA6g	510 µl	90 µl			0,90

\* Konzentration im Eluat

Die Vials werden jeweils mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

## 2.8 Injektionsvolumen

Das Injektionsvolumen wird an die Empfindlichkeit des Verfahrens angepasst. Ein Injektionsvolumen von 25 µl kann als Orientierungswert verwendet werden.

## 2.9 Analysensequenz

### 2.9.1 Grobe Kalibrierung

Kalibrierung frühestens nach 5 h beginnen!

Eine Kalibrierung nach der Stabilisierungsphase (> 5 h) des Gerätes und am Ende der Sequenz; bei längeren Sequenzen alle 9 h eine Kalibrierung.

Zu Beginn der Vortest-Sequenz werden die Kalibrierlösungen mit

- 0,005 / 0,01 / 0,02 / 0,05 / 0,1 / 0,2 und 0,5 pg/µl

mit der Gradienten-Methode analysiert.

### 2.9.2 Feine Kalibrierung

Kalibrierung frühestens nach 5 h beginnen!

Eine Kalibrierung nach der Stabilisierungsphase (> 5 h) des Gerätes und am Ende der Sequenz; bei längeren Sequenzen alle 9 h eine Kalibrierung.

Für den Matrixtest, die Spurenanalyse und das Standardadditionsverfahren wird eine detailliertere Kalibrierung eingesetzt.

Um eine möglichst genaue Kalibrierung zu ermöglichen, kann der Kalibrierbereich in drei Teilbereiche untergliedert werden:

1. Unterer Bereich: 0,005 bis 0,025 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte
2. Mittlerer Bereich: 0,025 bis 0,125 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte
3. Oberer Bereich: 0,1 bis 0,5 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte

### 2.9.3 Qualitätssicherung

In regelmäßigen Abständen, mindestens vor jeder Proben-Teilsequenz, wird eine Lösung mit einer (Nominal-)Konzentration von 0,1 µg/l analysiert, um ggf. eine Änderung der Signalintensität erkennen zu können.

In den ersten 5 Stunden pro Stunde mindestens 1 QC. Nach 5 Stunden genügt ein QC alle 5 Stunden.

### 2.9.4 Blindwerte

Zu Beginn jeder Sequenz, nach jeder Kalibrier-Teilsequenz sowie nach jedem QC wird Mischung B (für Gradienten-Methode) bzw. C (für isokratische Methode) ins UPLC injiziert.

### 2.9.5 Vortest-Sequenz

Die Vortests werden nur mit der Gradienten-Methode und ohne Zudosierung von Lösung SA durchgeführt.

Die neutrale und die angesäuerte Probe (nVg bzw. sVg) werden für jede Wasserprobe bzw. Eluatfraktion direkt nacheinander injiziert.

Wenn mehrere aufeinanderfolgende Eluatfraktionen (F1, F2, ...) vorhanden sind, so werden diese zusammenhängend analysiert (F1nVg, F1sVg, F2nVg, F2sVg, ...).

#### **Achtung:**

Im Anschluss an die Auswertung der Vortest-Sequenz muss entschieden werden, ob das MS/MS aufgrund von hohen Analyt-Konzentrationen (> 1 µg/l in der Ausgangsprobe) bei bestimmten Wasserproben bzw. Eluatfraktionen in der

anschließenden Sequenz für Matrixtest und Spurenanalyse für bestimmte Massenübergänge blind geschaltet werden muss. Dies kann beispielsweise bei 4,4'-MDA gehäuft auftreten.

## 2.9.6 Sequenz für Matrixtest, Spurenanalyse und Standardadditionsverfahren

In der Sequenz für den Matrixtest und die Spurenanalyse werden zunächst alle Läufe mit der Gradienten-Methode durchgeführt, anschließend werden die Läufe mit der isokratischen Methode gefahren.

### **Achtung:**

Gradienten-Methode und isokratische Methode nicht abwechselnd einsetzen, da dies zu einer Verschiebung der Laufzeiten und einer Veränderung des Trennverhaltens führt!

Die neutrale und die angesäuerte Probe (nSg und sSg bzw. nSi und sSi) werden für jede Wasserprobe bzw. Eluatfraktion direkt nacheinander injiziert.

Wenn mehrere aufeinanderfolgende Eluatfraktionen (F1, F2, ...) vorhanden sind, so werden diese zusammenhängend analysiert (F1nSg, F1sSg, F2nSg, F2sSg, ...).

Die Spurenanalyse-Teilsequenz wird vor die Matrixtest-Teilsequenz gesetzt, um Verschleppungseffekte durch den zudosierten Standard auszuschließen. Gleiches gilt für eine eventuell notwendige Teilsequenz mit Proben aus dem Standardadditionsverfahren. Ggf. sind (mind.) 2 Blindwerte einzuschleiben.

## 2.10 Berechnung der Konzentrationen in den Proben

Für die Auswertung der Vortests wird die Konzentration in der Wasserprobe mit den in dieser Verfahrensbeschreibung vorgegebenen Volumina (Ziffer 2.3) mit Formel (1) aus der im Vial ermittelten Konzentration berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = C_{\text{Vial}} \cdot \frac{1500 \mu\text{L}}{15 \mu\text{L}} = C_{\text{Vial}} \cdot 100 \quad (1)$$

mit  $C_{\text{Probe}}$  = Konzentration in der Wasserprobe  
 $C_{\text{Vial}}$  = analysierte Konzentration im Probenvial

Für die Auswertung der Spurenanalyse wird die Konzentrationen in der Wasserprobe mit den in dieser Verfahrensbeschreibung vorgegebenen Volumina (Ziffer 2.5) mit Formel (2) aus der im Vial ermittelten Konzentration berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = C_{\text{Vial}} \cdot \frac{1200 \mu\text{L}}{600 \mu\text{L}} = C_{\text{Vial}} \cdot 2 \quad (2)$$

mit  $C_{\text{Probe}}$  = Konzentration in der Wasserprobe  
 $C_{\text{Vial}}$  = analysierte Konzentration im Probenvial

Für die Auswertung des Matrixtests wird die Konzentration in der Wasserprobe mit den in dieser Verfahrensbeschreibung vorgegebenen Volumina (Ziffer 2.4) mit Formel (3) aus der im Vial ermittelten Konzentration berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = \left( C_{\text{Vial}} - \frac{20 \mu\text{L} \cdot C_{\text{SA}} \cdot F_1 \cdot F_2}{1200 \mu\text{L}} \right) \cdot \frac{1200 \mu\text{L}}{600 \mu\text{L}} = (C_{\text{Vial}} - C_{\text{zud}}) \cdot 2 \quad (3)$$

mit  $C_{\text{Probe}}$  = Konzentration in der Wasserprobe  
 $C_{\text{Vial}}$  = analysierte Konzentration im Probenvial  
 $C_{\text{SA}} \cdot F_1$  = nominale Konzentration in der zudosierten Lösung sowie Verdünnungskorrekturfaktor; s. Tabelle 11 in Ziffer 1.4  
 $F_2$  = Einwaagekorrekturfaktor  
 $C_{\text{zud}}$  = Konzentration, die beim Matrixtest zudosiert wurde

## A.8 Anhang 8: Für die zukünftige, routinemäßige Aminanalyse vorgeschlagene UPLC-MS/MS-Verfahrensbeschreibung

### 1 Vorbereitung

#### 1.1 Lösungsmittelmischungen und verdünnte Säuren

##### 1.1.1 Laufmittel A und B

###### Laufmittel A

Acetonitril mit 0,02 Vol.-% Ameisensäure

Zu 2,5 l Acetonitril werden 500 µl Ameisensäure zugegeben.

###### Laufmittel B

Reinstwasser mit 0,02 Vol.-% Ameisensäure

Zu 2,5 l Reinstwasser werden 500 µl Ameisensäure zugegeben.

##### 1.1.2 Mischung A und C

###### Mischung A

Die Mischung A wird für das Ansetzen der Stammlösungen eingesetzt.

Mischung A entspricht im Wesentlichen der Zusammensetzung des Laufmittels der isokratischen UPLC-Methode; der höhere Gehalt an Ameisensäure wird benötigt, um die basischen Amine zu neutralisieren und um die Löslichkeit zu steigern.

Mischung A:

160 mL Acetonitril / 300 mL Reinstwasser / 250 µL Ameisensäure  
=> ergibt ca. 460 mL zum Ansetzen der Stammlösungen

###### Mischung C

Die Mischung C wird zum Verdünnen bei den Verdünnungsreihen für die Kalibrierung des Analysenverfahrens verwendet.

Mischung C entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels der isokratischen UPLC-Methode.

Mischung C:

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

### 1.1.3 Mischung N

#### Mischung N

Die Mischung N wird einer neutralen Wasserprobe vor der instrumentellen Analyse im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Mischung N:

350 mL Acetonitril / 150 mL Reinstwasser / 200 µL Ameisensäure

=> ergibt ca. 500 mL

Die 1:1-Mischung der Wasserprobe mit Mischung N entspricht der Zusammensetzung des Laufmittels bei der isokratischen UPLC-Methode. Diese Mischung wird sowohl für die isokratische UPLC-Methode als auch für die Gradientenmethode eingesetzt.

### 1.2 Ansetzen der Stammlösungen

Die Stammlösungen werden in Mischung A angesetzt. Die Einwaagen und Zielkonzentrationen sind in Tabelle 1 bis Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 1:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S1. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S1 ist im Kühlschrank bei 6 °C 15 Monate haltbar.

<b>Amin Nr.</b>	<b>Amin</b>	<b>Einwaage Amin [mg]</b>	<b>Messkolben [ml]</b>	<b>Konz. Amin [ng/µl]</b>
A14	4-Aminobiphenyl	10	50	200
A19	4,4'-Thiodianilin	10		200
A20	o-Aminoazotoluol	10		200
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	10		200

Tabelle 2:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S2. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S2 ist im Kühlschrank bei 6 °C 15 Monate haltbar.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A01	o-Toluidin	10	50	200
A07	2,4,5-Trimethylanilin	10		200
A08	p-Kresidin	10		200
A11	4-Chlor-2-methylanilin	10		200

Tabelle 3:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S3. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S1 ist im Kühlschrank bei 6 °C 15 Monate haltbar.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A16	4,4'-MDA	10	50	200
A17	4,4'-Oxydianilin	10		200
A21	3,3'-Dimethyl-4,4'-MDA	10		200
A23	3,3'-Dichlor-4,4'-MDA	10		200

Tabelle 4:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S4. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S4 ist im Kühlschrank bei 6 °C 6 Monat haltbar.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/μl]
A04	2,4-TDA	10	50	200
A06	4-Chloranilin *	10		200
A13	2-Naphthylamin	10		200

\* stabiles Amin als Referenz

Tabelle 5:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S5. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S5 ist im Kühlschrank bei 6 °C 1 Wochen haltbar. Anschließend kann die Lösung für die semi-quantitative Analyse eingesetzt werden.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/µl]
A09	2,4-Diaminoanisol	10	50	200
A15	Benzidin	10		200
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	10		200

Tabelle 6:

Empfohlene Einwaage für die Stammlösung S6. Lösungsmittel: Mischung A. Die Stammlösung S6 kann – im Kühlschrank bei 6 °C gelagert – 24 Monate für die qualitative Differenzierung eingesetzt werden.

Amin Nr.	Amin	Einwaage Amin [mg]	Messkolben [ml]	Konz. Amin [ng/µl]
A02	m-Toluidin	10	50	200
A03	p-Toluidin	10		200
A05	2,6-TDA	10		200
A10	3-Chlor-2-methylanilin	10		200
A12	1-Naphthylamin	10		200

### 1.3 Verdünnungsreihen für die Kalibrierung

Die Lösung V1 wird durch Mischen und Verdünnen der sechs Stammlösungen S1 bis S6 hergestellt (Tabelle 7). Die Analyt-Konzentrationen in der Lösung V1 können aus der Nominal-Konzentration der Lösung V1 (und aller weiteren daraus hergestellten Verdünnungen) durch Multiplizieren mit dem entsprechenden, in Tabelle 8 aufgelisteten Faktor berechnet werden.

Anschließend wird die Lösung V1 um den Faktor 500 verdünnt. Die bei der Verdünnung mit Mischung C entstehende Lösung wird V2 genannt (Tabelle 9). Die Kalibrierlösungen werden in 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss durch Verdünnen mit Mischung C (Tabelle 10) hergestellt.

Tabelle 7:

Herstellung der Lösung V1 aus den Stammlösungen S1 bis S6 durch Verdünnung in einem 10 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung C.

Quelle	Amin	$C_S$ [ng/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{V1}$ [pg/ $\mu$ l]
S1	4-Aminobiphenyl	200	25	500
	4,4'-Thiodianilin	200		500
	o-Aminoazotoluol	200		500
	3,3'-Dichlorbenzidin	200		500
S2	o-Toluidin	200	25	500
	2,4,5-Trimethylanilin	200		500
	p-Kresidin	200		500
	4-Chlor-2-methylanilin	200		500
S3	4,4'-MDA	200	25	500
	4,4'-Oxydianilin	200		500
	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	200		500
	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	200		500
S4	2,4-TDA	200	25	500
	4-Chloranilin	200		500
	2-Naphthylamin	200		500
S5	2,4-Diaminoanisol	200	500	10.000
	Benzidin	200		10.000
	3,3'-Dimethylbenzidin	200		10.000
S6	m-Toluidin	200	10	200
	p-Toluidin	200		200
	2,6-TDA	200		200
	3-Chlor-2-methylanilin	200		200
	1-Naphthylamin	200		200

Tabelle 8:

Faktor zur Berechnung einer Analyt-Konzentration in der Kalibrierlösung aus der jeweiligen Nominal-Konzentration.

<b>Amin Nr.</b>	<b>Amin</b>	<b>Faktor</b>
--	Nominal-Konzentration	1
A01	o-Toluidin	1
A02	m-Toluidin	0,4
A03	p-Toluidin	0,4
A04	2,4-TDA	1
A05	2,6-TDA	0,4
A06	4-Chloranilin	1
A07	2,4,5-Trimethylanilin	1
A08	p-Kresidin	1
A09	2,4-Diaminoanisol	20
A10	3-Chlor-2-methylanilin	0,4
A11	4-Chlor-2-methylanilin	1
A12	1-Naphthylamin	0,4
A13	2-Naphthylamin	1
A14	4-Aminobiphenyl	1
A15	Benzidin	20
A16	4,4'-MDA	1
A17	4,4'-Oxydianilin	1
A18	3,3'-Dimethylbenzidin	20
A19	4,4'-Thiodianilin	1
A20	o-Aminoazotoluol	1
A21	2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	1
A22	3,3'-Dichlorbenzidin	1
A23	2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	1

Tabelle 9:  
Herstellung der Lösung V2 aus der Lösung V1 durch Verdünnung um Faktor 500 in einem 20 ml Messkolben. Lösungsmittel: Mischung C.

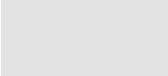
Quelle	Amin	$C_{V1}$ [pg/ $\mu$ l]	zudos. Vol. [ $\mu$ l]	$C_{V2}$ [pg/ $\mu$ l]
V1	o-Toluidin	500	40	1
	m-Toluidin	200		0,4
	p-Toluidin	200		0,4
	2,4-TDA	500		1
	2,6-TDA	200		0,4
	4-Chloranilin	500		1
	2,4,5-Trimethylanilin	500		1
	p-Kresidin	500		1
	2,4-Diaminoanisol	10.000		20
	3-Chlor-2-methylanilin	200		0,4
	4-Chlor-2-methylanilin	500		1
	1-Naphthylamin	200		0,4
	2-Naphthylamin	500		1
	4-Aminobiphenyl	500		1
	Benzidin	10.000		20
	4,4'-MDA	500		1
	4,4'-Oxydianilin	500		1
	3,3'-Dimethylbenzidin	10.000		20
	4,4'-Thiodianilin	500		1
	o-Aminoazotoluol	500		1
2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA	500	1		
3,3'-Dichlorbenzidin	500	1		
2,2'-Dichlor-4,4'-MDA	500	1		

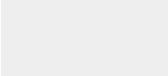
Die Kalibrierreihe wird in 1,5 ml Vials mit Crimpverschluss angesetzt. Die zuzugebenden Volumina sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10:

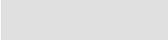
Beispielhafte Verdünnungen für die Kalibrierung des Verfahrens. Lösungsmittel: Mischung C.

Bez.	Vol. Mischung C [µl]	Konz. V2 [pg/µl]		Vol. V2 [µl]	Ges.-vol. [µl]	nominale Konz. [µg/l]	
		nominal	max.			Vial	Probe*
K010	990	1	20	10	1.000	0,01	0,2
K020	980			20	1.000	0,02	0,4
K030	970			30		0,03	0,6
K040	960			40		0,04	0,8
K050	950			50	1.000	0,05	1,0
K100	900			100	1.000	0,10	2,0
K150	850			150	1.000	0,15	3,0
K200	800			200	1.000	0,20	4,0
K250	750			250	1.000	0,25	5,0
K300	700			300	1.000	0,30	6,0
K350	650			350	1.000	0,35	7,0
K400	600			400	1.000	0,40	8,0
K450	550			450	1.000	0,45	9,0
K900	100			900	1.000	0,90	18

 = wird sowohl für den Vortest (V) als auch für das Standardadditionsverfahren (A) eingesetzt

 = wird sowohl für das Standardadditionsverfahren (A) als auch für die Qualitätssicherung (QC) eingesetzt

 = wird nur für das Standardadditionsverfahren (A) eingesetzt

 = wird nur für den Vortest (V) eingesetzt

\* Angaben für den Vortest mit 1:20-Verdünnung.

## 1.4 Stabilität der Lösungen

Unter den eingesetzten aromatischen Aminen sind Amine enthalten, die sehr schnell abgebaut werden bzw. werden können. Benzidin und Benzidin-Derivate können zum entsprechenden Chinon-Derivat dehydriert bzw. oxidiert werden (Bild 1).

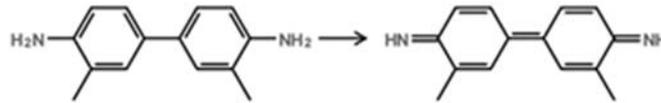


Bild 1:  
3,3'-Dimethylbenzidin als Beispiel für ein leicht oxidierbares Amin vor und nach der Oxidation/Dehydrierung.

Die instabilen Amine degradieren bereits innerhalb weniger Tage bzw. Wochen. Infolge dessen muss die Benzidin-/3,3'-Dimethylbenzidin-/2,4-Diaminoanisol-Lösung bzw. die Stammlösung S5 (Tabelle 5) für die Kalibrierstandards immer frisch angesetzt werden.

Die Lagerung aller Lösungen erfolgt bei 6 °C im Kühlschrank und in Vials mit Crimp-Verschluss.

Die Stammlösungen S1, S2 und S3 sind mindestens 15 Monate stabil und können auf Vorrat hergestellt werden. Die Stammlösung S4 ist mindestens 6 Monate stabil.

Die Stammlösung S6 (Tabelle 6) enthält Amine mit Strukturisomerie (z. B. 2,6-TDA und 3-Chlor-2-methylanilin) zu den eigentlich interessierenden Aminen (2,4-TDA und 4-Chlor-2-methylanilin). Wenn S6 nur für die Zuordnung der Isomere im Chromatogramm eingesetzt wird, ist eine Verwendung für bis zu 24 Monate akzeptabel.

Ein weiterer Effekt, der zu Verlusten bei den 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  $\pi$ -System wird die Adsorption an Glasgefäß-Oberflächen und Oberflächen im UPLC-MS/MS-System begünstigt. Durch einen Acetonitrilanteil von 35 % (in Kombination mit 0,02 % Ameisensäure) werden die Adsorptionseffekte reduziert. Bei hohen Konzentrationen, wie beispielsweise bei den Stammlösungen und der Lösung V1, ist der adsorptive Effekt vernachlässigbar. Die stark verdünnten Kalibrierlösungen müssen nach Bedarf immer frisch angesetzt werden.

## 2 Durchführung

### 2.1 Allgemeine Vorgehensweise

In Tabelle 11 sind systematische Kurzbezeichnungen für die Analysen bzw. Untersuchungen je Wasserprobe bzw. Eluatfraktion und weitere Angaben aufgelistet.

Tabelle 11:

Für die Instrumentelle Analytik zu verwendende, präparierte Proben mit zugehöriger Benennung.

Art der Analyse	Verdünnung	Standard-addition	UPLC-Methode	Neutrale Probe *	addierte Konz. [ $\mu\text{g/L}$ ]
Vortest	1:20	nein	Gradient	nVg	--
Standard-additions-verfahren	1:2	ja (5 Konz.)	Gradient	(nA0g)	--
				nA1g	0,05
				nA2g	0,15
				nA3g	0,25
				nA4g	0,35
				nA5g	0,45

\* Bereits angesäuerte Proben werden mit „s“ statt „n“ benannt. Mit der isokratischen Methode analysierte Proben werden mit „i“ statt „g“ benannt.

Da in Eluatfraktionen insbesondere 4,4'-MDA gelegentlich in sehr hohen Konzentrationen ( $> 10 \mu\text{g/l}$ ) enthalten ist, sind Vortests mit hoher Verdünnung angeraten (Tabelle 11, Bezeichnung „nVg“, Verdünnung 1:20). Treten hohe Konzentrationen eines analysierten Amins auf, so ist das Massenspektrometer bei den anschließenden Analysen mit geringer verdünnten Proben (1:2-Verdünnung) für die zugehörige Masse blind zu schalten. Bei Trinkwasserproben oder anderen Wasserproben, bei denen bekannt ist, dass sie keine Analyt-Konzentrationen über  $1 \mu\text{g/l}$  enthalten, kann der Vortest weggelassen werden.

Aufgrund der möglichen Beeinflussung der Elektrospray-Ionisation durch bei der Chromatographie co-eluierende Matrixbestandteile ist es bei geringer Verdünnung geboten, grundsätzlich das Standardadditionsverfahren anzuwenden.

### 2.2 Durchführung der Probenahme

An der Probenahmestelle werden für jede Wasserprobe bzw. Eluatfraktion ein 100 ml (oder 50 ml) Schraubdeckelglasgefäß mit einer eindeutig zuordenbaren Proben- und Fraktionsnummer sowie mit dem Code „n“ oder „s“ beschriftet.

**„n“-Probe** = neutrale Probe

Für eine neutrale Probe werden 100 ml Wasserprobe in ein 100 ml Schraubdeckelglas abgefüllt. (möglichst luftfrei, ein exaktes Volumen ist nicht erforderlich.)

ggf. **„s“-Probe** = angesäuerte Probe

Für eine angesäuerten Proben werden zu 100 mL Wasserprobe 20 µl unverdünnte Ameisensäure zugegeben.

### 2.3 Filtrierung der Proben

Wichtig:

Die Probelösungen sind vor der Verdünnung mit 0,2 µm hPTFE-Filtern (hydrophiles Polytetrafluorethylen) zu filtrieren. Die Filter sind zunächst mit 2 mL der jeweiligen Probe zu spülen. Die filtrierten Proben werden in ein beschriftetes 4 ml Schraubdeckelglas abgefüllt.

### 2.4 Probenvorbereitung für den Vortest (V)

Für den Vortest auf hohe Konzentrationen z. B. an 4,4'-MDA werden für jede Wasserprobe ein 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. Das Vial wird mit der laborinternen Probennummer, ggf. der Fraktionsnummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- nVg entspricht einer neutralen Probe mit der Gradienten-Methode („g“ steht für Gradientenmethode und „i“ für isokratische Methode)
- sVg entspricht einer angesäuerten Probe mit der Gradienten-Methode

In das Vial werden 950 µl Mischung C vorgelegt.

Anschließend werden 50 µl Wasserprobe aus dem 4 ml Schraubdeckelglas mit der filtrierten Probenlösung überführt (oder jeweils 25 µl aus zwei filtrierten Fraktionsproben). Das Vial wird mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

**Achtung:**

Im Anschluss an die Auswertung der Vortest-Sequenz muss entschieden werden, ob das MS/MS aufgrund von hohen Analyt-Konzentrationen (> 10 µg/L in der Ausgangsprobe) für bestimmte Massenübergänge in der anschließenden Spurenanalysen-Sequenz blind geschaltet werden muss. Dies kann beispielsweise bei 4,4'-MDA gehäuft auftreten.

## 2.5 Standardadditionsverfahren (A) nach DIN 32633

Für jede Wasserprobe bzw. Eluatfraktion werden fünf 1,5 ml Vials mit Crimp-Verschluss benötigt. [Wenn auch ohne Amin-Zugabe analysiert werden soll, dann werden sechs Vials benötigt => zzgl. nA0g]

Die fünf Vials werden mit der laborinternen Probennummer, ggf. der Fraktionsnummer sowie folgenden Codes beschriftet:

- nA1g entspricht 0,05 pg/µl im Vial und 0,1 pg/µL in der Probe
- nA2g entspricht 0,15 pg/ µl im Vial und 0,3 pg/µL in der Probe
- nA3g entspricht 0,25 pg/ µl im Vial und 0,5 pg/µL in der Probe
- nA4g entspricht 0,35 pg/ µl im Vial und 0,7 pg/µL in der Probe
- nA5g entspricht 0,45 pg/ µl im Vial und 0,9 pg/µL in der Probe

Für die Mischung zweier Fraktionen\* (s. Tabelle 12) werden in alle 5 Vials jeweils 300 µl aus den beiden entsprechenden 4 ml Schraubdeckelgläsern mit den filtrierten Probenlösungen vorgelegt.

Danach werden in die 5 (oder 6 Vials) die Mischung N sowie die Lösung V2 mit einer 1.000 µl Messpipette zudosiert. Die Volumina sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12:

Zuzudosierende Volumina für das Standardadditionsverfahren [12].

Vial	Mischung N	Lösung V2	Proben- volumen	Gesamt- volumen	Vial <sup>§</sup> [pg/µL]	Probe <sup>#</sup> [pg/µl]
(nA0g)	600 µl	0 µl	600 µl*	1.200 µl	0,00	0,0
nA1g	540 µl	60 µl	600 µl*		0,05	0,1
nA2g	420 µl	180 µl	600 µl*		0,15	0,3
nA3g	300 µl	300 µl	600 µl*		0,25	0,5
nA4g	180 µl	420 µl	600 µl*		0,35	0,7
nA5g	60 µl	540 µl	600 µl*		0,45	0,9

\* Bei Mischung von 2 Fraktionen je Fraktion 300 µL

Bei Mischung von 3 Fraktionen je Fraktion 200 µL

Bei Mischung von 4 Fraktionen je Fraktion 150 µL

Bei Mischung von 5 Fraktionen je Fraktion 120 µL

§ Nominalkonzentration im Vial; siehe Tabelle 8

# Verdünnungsfaktor 2

Die Vials werden jeweils mit einem Kreuzschlitz-Septum verschlossen, geschüttelt und der instrumentellen Analytik zugeführt.

## 2.6 Injektionsvolumen

Das Injektionsvolumen wird an die Empfindlichkeit des Verfahrens angepasst. Ein Injektionsvolumen von 25 µl kann als Orientierungswert verwendet werden.

## 2.7 Analysensequenz

### **Achtung:**

Gradienten-Methode und isokratische Methode nicht abwechselnd einsetzen, da dies zu einer Verschiebung der Laufzeiten und einer Veränderung des Trennverhaltens führt!

### 2.7.1 Grobe Kalibrierung

Kalibrierung frühestens nach 20 Läufen beginnen!

Eine Kalibrierung nach der Stabilisierungsphase (> 6 h) des Gerätes und am Ende der Sequenz; bei längeren Sequenzen alle 30 Läufe eine Kalibrierung.

Zu Beginn der Vortest-Sequenz werden die Kalibrierlösungen mit

- 0,05 / 0,15 / 0,45 und 0,90 pg/µl (siehe Tabelle 10)

mit der Gradienten-Methode analysiert (Konzentrationen im Vial). Die Vials mit 0,15 µg/l und 0,45 µg/l werden zusätzlich bzw. zugleich für die Qualitätssicherung (QC150 bzw. QC450; Ziffer 2.7.3) eingesetzt.

### 2.7.2 Feine Kalibrierung

Kalibrierung frühestens nach 20 Läufen (ca. 6 h) beginnen!

Eine Kalibrierung nach der Stabilisierungsphase (> 6 h) des Gerätes und am Ende der Sequenz; bei längeren Sequenzen alle 30 Läufe eine Kalibrierung.

Für den Vortest kann eine detailliertere Kalibrierung eingesetzt werden. Um eine möglichst genaue Kalibrierung zu ermöglichen, kann der Kalibrierbereich (Konzentration im Vial) in drei Teilbereiche untergliedert werden:

- Unterer Bereich: 0,02 bis 0,18 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte
- Mittlerer Bereich: 0,05 bis 0,45 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte
- Oberer Bereich: 0,1 bis 0,9 pg/µl; 5 äquidistante Messpunkte

### 2.7.3 Qualitätssicherung

In regelmäßigen Abständen, mindestens vor jeder Harzprodukt-Teilsequenz, wird eine Lösung mit einer (Nominal-)Konzentration von 0,15 µg/l (QC150) und

0,45 µg/L (QC450) analysiert, um ggf. eine Änderung der Signalintensität erkennen zu können (Verdünnungen s. Tabelle 10):

- In den ersten 20 Läufen sollte jeder 3. Lauf ein QC150 sein. Falls zu Beginn nur qualitativ gemessen wird, kann auf die QC150-Injektionen verzichtet werden.
- Etwa Lauf Nr. 25 + 26 (QC150 und QC450)
- Etwa Lauf Nr. 30 + 31 (QC150 und QC450)
- Etwa Lauf Nr. 40 + 41 (QC150 und QC450)
- Anschließend im Abstand von ca. 20 bis 30 Läufen (QC150 und QC450) (20 bzw. 30 Läufe entsprechen 5,8 h bzw. 8,7 h)
- Außerdem: Direkt vor oder nach jeder Kalibrierung (durch Blindwerte getrennt), die nicht bereits die QC-Konzentrationen 0,15 µg/L und 0,45 µg/L enthalten.

#### 2.7.4 Blindwerte

Zu Beginn jeder Sequenz, vor jeder Teilsequenz (Kalibrierung, Harz) sowie nach jedem QC450 wird die für die Verdünnung verwendete Mischung C injiziert.

#### 2.7.5 Vortest-Sequenz

Die Vortests werden nur mit der Gradienten-Methode und ohne Zudosierung von Lösung V2 durchgeführt. Zwischen den einzelnen Proben-Teilsequenzen werden Blindwerte eingeschoben.

Wenn mehrere aufeinanderfolgende Eluatfraktionen (F1, F2, ...) vorhanden sind, so werden diese zusammenhängend analysiert (F1nVg, F2nVg, F3nVg, F4nVg, ...).

Falls sowohl angesäuerte als auch neutrale Proben vorhanden sind, werden die neutrale und die angesäuerte Probe (nVg bzw. sVg) für jede Wasserprobe bzw. Eluatfraktion direkt nacheinander injiziert (F1nVg, F2nVg, ..., F1sVg, F2sVg, ...).

##### **Achtung:**

Im Anschluss an die Auswertung der Vortest-Sequenz muss entschieden werden, ob das MS/MS aufgrund von hohen Analyt-Konzentrationen (> 1 µg/l in der Ausgangsprobe) bei bestimmten Wasserproben bzw. Eluatfraktionen in der anschließenden Sequenz für das Standardadditionsverfahren für bestimmte Massenübergänge blind geschaltet werden muss.

#### 2.7.6 Sequenz für das Standardadditionsverfahren

Die Standardadditionsmischungen (5 Konzentrationen ggf. zzgl. ohne Aminzusatz) werden zusammenhängend analysiert. Zwischen den einzelnen Proben-Teilsequenzen werden Blindwerte eingeschoben.

Wenn mehrere aufeinanderfolgende Eluatfraktionen (F1, F2, ...) vorhanden sind, so werden diese zusammenhängend analysiert (F1nA1g, F1nA2g, ..., F2nA1g, F2nA2g, ...).

## 2.8 Berechnung der Konzentrationen in den Proben

Für die Auswertung der Vortests wird die Konzentration in der Wasserprobe mit den in dieser Verfahrensbeschreibung vorgegebenen Volumina (Ziffer 2.3) mit Formel (1) aus der im Vial ermittelten Konzentration berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = C_{\text{Vial}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}} = C_{\text{Vial}} \cdot 20 \quad (1)$$

mit  $C_{\text{Probe}}$  = Konzentration in der Wasserprobe bzw. Mischfraktion  
 $C_{\text{Vial}}$  = analysierte Konzentration im Probenvial

Das Standardadditionsverfahren bzw. das Verfahren der Standardaddition wird zunächst nach DIN 32633:2013-05 [12] ausgewertet. Aus dem Ergebnis des Standardadditionsverfahrens wird mit den in dieser Verfahrensbeschreibung vorgegebenen Volumina (Ziffer 2.4, Tabelle 12) die Konzentration in der Probe nach Formel (2) berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = C_{\text{StAd}} \cdot \frac{1200 \mu\text{L}}{600 \mu\text{L}} = C_{\text{StAd}} \cdot 2 \quad (2)$$

mit  $C_{\text{Probe}}$  = Konzentration in der Wasserprobe bzw. Mischfraktion  
 $C_{\text{StAd}}$  = Konzentration, die mit dem Verfahren der Standardaddition nach DIN 32633:2013-05 [12] ermittelt wurde

## Bildverzeichnis

Bild 1: Strukturformeln der Amine Nr. A01 bis A13.	15
Bild 2: Strukturformeln der Amine Nr. A14 bis A23.	16
Bild 3: Inverser Säulenversuch: Umspülung des zuvor injizierten Probekörpers mit Leitungswasser und Auffangen des Eluats. Fluss: 4 L/h; Fraktionsvolumen: 2 L (entspricht 0,5 h).	20
Bild 4: Konzentrationen, die nach Zugabe der Mischungen A, B, C oder D in den Proben erhalten werden (0,1 bis 4,7 µg/L).	21
Bild 5: Laufmittel-Gradient für die UPLC.	25
Bild 6: Vergleich der Steigungen der Kalibriergeraden für die 15 stabilen Amine und die drei (nominalen) Konzentrationsbereiche 0,01 bis 0,09 µg/L (MW: 0,05 µg/L), 0,05 bis 0,45 µg/L (MW: 0,25 µg/L) und 0,2 bis 1,8 µg/L (MW: 1,0 µg/L) [Injektionsvolumen: 25 µL].	32
Bild 7: Kalibrierung von o-Toluidin (A01) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.	33
Bild 8: Kalibrierung von 2,4-TDA (A04) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.	33
Bild 9: Kalibrierung von 4-Chloranilin (A06) im Konzentrationsbereich bis 0,7 µg/L.	34
Bild 10: Kalibrierung von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	34
Bild 11: Kalibrierung von p-Kresidin (A08) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	35
Bild 12: Kalibrierung von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	35
Bild 13: Kalibrierung von 2-Naphthylamin (A13) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	36
Bild 14: Kalibrierung von 4-Aminobiphenyl (A14) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	36
Bild 15: Kalibrierung von 4,4'-MDA (A16) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	37
Bild 16: Kalibrierung von 4,4'-Oxydianilin (A17) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	37
Bild 17: Kalibrierung von 4,4'-Thiodianilin (A19) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	38

Bild 18: Kalibrierung von o-Aminoazotoluol (A20) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	38
Bild 19: Kalibrierung von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	39
Bild 20: Kalibrierung von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	39
Bild 21: Kalibrierung von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) im Konz.-bereich bis 0,7 µg/L.	40
Bild 22: Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A11 und A13.	42
Bild 23: Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für 11 Amine.	43
Bild 24: Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A06 und A23.	43
Bild 25: Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A16 und A17.	44
Bild 26: Qualitätskontrolle mit 0,2 µg/L und 1,0 µg/L für die Amine A01 und A02.	44
Bild 27: Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für diverse Konzentrationen von 2,4-Diaminoanisol (A09).	46
Bild 28: Relativer Verlauf des Messsignals (erste Messung entspricht 100 %) für 2,4-Diaminoanisol (A09).	47
Bild 29: Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für 5 Konzentrationen von Benzidin (A15).	48
Bild 30: Relativer Verlauf des Messsignals (bei jeder Konzentration entspricht erste Messung 100 %) für Benzidin (A15).	49
Bild 31: Verlauf des Messsignals (Flächenintegral in Tsd.) für diverse Konzentrationen von 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).	50
Bild 32: Relativer Verlauf des Messsignals (bei jeder Konzentration entspricht erste Messung 100 %) für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).	50
Bild 33: Kalibrierkurve für Benzidin (A15). Im Konzentrationsbereich bis 1,8 µg muss eine quadratische Regression verwendet werden. Ab 2 µg/L ist der Verlauf linear.	52
Bild 34: Kalibrierkurve für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18). Im Konzentrationsbereich bis 1,8 µg muss eine quadratische Regression verwendet werden, ab 2 µg/L ist der Verlauf linear.	53

Bild 35: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der höchsten zudosierten Konzentration (1,3 bis 4,7 µg/L).	56
Bild 36: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der zweithöchsten zudosierten Konzentration (0,9 bis 2,6 µg/L).	58
Bild 37: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der zweitkleinsten zudosierten Konzentration (0,4 bis 1,2 µg/L).	60
Bild 38: Gemessene Amin-Konzentrationen im Vergleich zu den berechneten Amin-Konzentrationen bei der kleinsten zudosierten Konzentration (0,1 bis 0,3 µg/L).	62
Bild 39: Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die LC-g-Ergebnisse.	65
Bild 40: Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die LC-i-Ergebnisse.	66
Bild 41: Methodenvergleich: Eluat- bzw. Matrixeinfluss auf die GC-Ergebnisse.	68
Bild 42: TOC-Gehalt (total organic carbon) sowie Konzentrationen der drei nachgewiesenen DIBt-Amine 4,4'-MDA (A16), 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) und 4-Chloranilin (A06) in den Vortests mit den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die Eluate sind in den Vials um den Faktor 100 verdünnt. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	70
Bild 43: Konzentrationen der drei nachgewiesenen DIBt-Amine 4,4'-MDA (A16), 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) und 4-Chloranilin (A06) in den Vortests mit den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die Eluate sind in den Vials um den Faktor 100 verdünnt.	71
Bild 44: Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. 1 µg/L im Eluat entspricht 0,5 µg/L in der Spurenanalyse sowie im Matrixtest und 0,01 µg/L im Vortest. Die im Matrixtest zudosierte Konzentration (0,338 µg/L im Eluat) ist rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	72
Bild 45: Konzentrationen des DIBt-Amins 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) in den neutralen Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. 1 µg/L im Eluat entspricht 0,5 µg/L in der Spurenanalyse sowie im Matrixtest und 0,01 µg/L im Vortest. Die im Matrixtest zudosierte Konzentration (0,314 µg/L im Eluat) ist rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	73

Bild 46: Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4,4'-MDA (A16) in den 1:100 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	74
Bild 47: Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den 1:100 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	75
Bild 48: Vergleich der Konzentrationen des DIBt-Amins 4-Chloranilin (A06) in den 1:2 verdünnten Lösungen der neutralen und angesäuerten Fraktionen des untersuchten Injektionsharzes. Die in den Matrixtests zudosierten Konzentrationen (je 0,338 µg/L im Eluat) sind rechnerisch abgezogen. Die roten Pfeile markieren die Fraktionen, die für die GC-MS-Analytik eingesetzt wurden.	76
Bild 49: Kalibrierung von o-Toluidin (A01) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.	81
Bild 50: Kalibrierung von 2,4-TDA (A04) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.	82
Bild 51: Kalibrierung von 4-Chloranilin (A06) im Konzentrationsbereich bis 2,5 µg/L.	82
Bild 52: Kalibrierung von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	83
Bild 53: Kalibrierung von p-Kresidin (A08) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	83
Bild 54: Kalibrierung von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	84
Bild 55: Kalibrierung von 2-Naphthylamin (A13) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	84
Bild 56: Kalibrierung von 4-Aminobiphenyl (A14) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	85
Bild 57: Kalibrierung von 4,4'-MDA (A16) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	85
Bild 58: Kalibrierung von 4,4'-Oxydianilin (A17) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	86
Bild 59: Kalibrierung von 4,4'-Thiodianilin (A19) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	86
Bild 60: Kalibrierung von o-Aminoazotoluol (A20) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	87

Bild 61: Kalibrierung von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	87
Bild 62: Kalibrierung von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	88
Bild 63: Kalibrierung von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) im Konz.-bereich bis 2,5 µg/L.	88
Bild 64: Stabilität von o-Toluidin (A01) in der Stammlösung.	89
Bild 65: Stabilität von 2,4-TDA (A04) in der Stammlösung.	90
Bild 66: Stabilität von 4-Chloranilin (A06) in der Stammlösung.	90
Bild 67: Stabilität von 2,4,5-Trimethylanilin (A07) in der Stammlösung.	91
Bild 68: Stabilität von p-Kresidin (A08) in der Stammlösung.	91
Bild 69: Stabilität von 4-Chlor-2-methylanilin (A11) in der Stammlösung.	92
Bild 70: Stabilität von 2-Naphthylamin (A13) in der Stammlösung.	92
Bild 71: Stabilität von 4-Aminobiphenyl (A14) in der Stammlösung.	93
Bild 72: Stabilität von 4,4'-MDA (A16) in der Stammlösung.	93
Bild 73: Stabilität von 4,4'-Oxydianilin (A17) in der Stammlösung.	94
Bild 74: Stabilität von 4,4'-Thiodianilin (A19) in der Stammlösung.	94
Bild 75: Stabilität von o-Aminoazotoluol (A20) in der Stammlösung.	95
Bild 76: Stabilität von 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21) in der Stammlösung.	95
Bild 77: Stabilität von 3,3'-Dichlorbenzidin (A22) in der Stammlösung.	96
Bild 78: Stabilität von 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23) in der Stammlösung.	96
Bild 79: Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung A.	97
Bild 80: Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung B.	98
Bild 81: Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung C.	99
Bild 82: Wiederfindung der zudosierten Amine in Mischung D.	100
Bild 83: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für o-Toluidin (A01).	101
Bild 84: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,4-TDA (A04).	102
Bild 85: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Chloranilin (A06).	102
Bild 86: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,4,5-Trimethylanilin (A07).	103

Bild 87: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für p-Kresidin (A08).	103
Bild 88: UPLC-MS/MS-Kalibrierkurve (quadratisch) für 2,4-Diaminoanisol (A09).	104
Bild 89: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Chlor-2-methylanilin (A11).	104
Bild 90: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2-Naphthylamin (A13).	105
Bild 91: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4-Aminobiphenyl (A14).	105
Bild 92: UPLC-MS/MS- Kalibrierkurve (quadratisch) für Benzidin (A15).	106
Bild 93: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-MDA (A16).	106
Bild 94: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-Oxydianilin (A17).	107
Bild 95: UPLC-MS/MS- Kalibrierkurve (quadratisch) für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).	107
Bild 96: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 4,4'-Thiodianilin (A19).	108
Bild 97: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für o-Aminoazotoluol (A20).	108
Bild 98: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21).	109
Bild 99: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 3,3'-Dichlorbenzidin (A22).	109
Bild 100: UPLC-MS/MS-Kalibriergerade für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23).	110
Bild 101: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für o-Toluidin (A01).	111
Bild 102: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4-TDA (A04).	112
Bild 103: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Chloranilin (A06).	112
Bild 104: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4,5-Trimethylanilin (A07).	113
Bild 105: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für p-Kresidin (A08).	113
Bild 106: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,4-Diaminoanisol (A09).	114
Bild 107: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Chlor-2-methylanilin (A11).	114
Bild 108: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2-Naphthylamin (A13).	115
Bild 109: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4-Aminobiphenyl (A14).	115

Bild 110: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für Benzidin (A15).	116
Bild 111: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-MDA (A16).	116
Bild 112: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-Oxydianilin (A17).	117
Bild 113: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 3,3'-Dimethylbenzidin (A18).	117
Bild 114: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 4,4'-Thiodianilin (A19).	118
Bild 115: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für o-Aminoazotoluol (A20).	118
Bild 116: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,2'-Dimethyl-4,4'-MDA (A21).	119
Bild 117: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 3,3'-Dichlorbenzidin (A22).	119
Bild 118: Methodenvergleich UPLC-MS/MS vs. GC-MS für 2,2'-Dichlor-4,4'-MDA (A23).	120
Bild 119: Konzentrationsverlauf bei der Elution des Probekörpers, der bei der Injektion von Harz A 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.	121

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Amine (inkl. CAS-Nummern) und deren Nummerierung und Benennung im Bericht (IBP) sowie beim DIBt.	14
Tabelle 2: CMR-Einstufung (C = cancerogen, M = mutagen, R = reproduktionstoxisch) für die 23 verwendeten aromatischen Amine.	17
Tabelle 3: Angesetzte Stammlösungen (S 1 bis S 6) im Laufe des Projektes ab März 2020. Einwaage i.d.R. zwischen 10 und 15 mg in 50 mL (min. 9 mg und max. 27 mg).	19
Tabelle 4: Angesetzte Proben für den Methodenvergleich.	22
Tabelle 5: ISV-Eluat-Fraktionsproben für das Produktscreening und den Zeitverlauf im ISV.	23
Tabelle 6: Bei der Tandemmassenspektrometrie genutzte Massenübergänge für die 18 DIBt-Amine.	24
Tabelle 7: Retentionszeiten der 18 DIBt-Amine sowie der 5 Isomere.	26
Tabelle 8: Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der Konz. von 10 bis 90 ng/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).	28
Tabelle 9: Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der Konz. von 50 bis 450 ng/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).	29
Tabelle 10: Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) bei Verwendung der Konz. von 0,2 bis 1,8 µg/L (9 äquidistante Konz., jeweils dreifach injiziert).	30
Tabelle 11: Geradensteigungen der Kalibriergeraden.	31
Tabelle 12: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Geradensteigungen der Kalibriergeraden ausgewählter Amine (A15, A18 u.a.) bei einer nominalen Konzentration von 0,2 bis 1,8 µg/L.	51
Tabelle 13: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Geradensteigungen der Kalibriergeraden ausgewählter Amine bei einer nominalen Konzentration von 1 bis 7 µg/L (A06, A11, A18) bzw. 2 bis 10 µg/L (A15, A18).	51