

**Bestimmung aromatischer Amine
mit On-line-SPE/HPLC
sowie mit GC/ECD nach Derivatisierung**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Melanie Leß

aus Homberg/Efze

Marburg/Lahn 2001

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN.....	IX
1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2 AROMATISCHE AMINE	3
2.1 Eigenschaften und Vorkommen in wäßrigen Umweltproben.....	3
2.2 Analytik aromatischer Amine.....	4
2.2.1 Anreicherung	4
2.2.2 Summenbestimmung aromatischer Amine	5
2.2.3 Bestimmung mit HPLC	6
2.3.4 Gaschromatographische Bestimmung	6
2.2.4 Trennung mit weiteren Verfahren	7
3 FESTPHASEN-EXTRAKTION.....	8
3.1 Allgemeines.....	8
3.2 SPE-Verfahren	9
3.3 Häufig verwendete Sorbentien für die Festphasenextraktion	11
3.3.1 Modifizierte Kieselgele.....	11
3.3.2 Ionenaustauscher	11
3.3.3 Graphitierter Kohlenstoff.....	12
3.3.4 Polymere Sorbentien.....	13
3.3.5 Immunosorbentien	14
3.3.6 „Molecular imprinted“ Sorbentien	15
3.4 On-line-SPE	15
4 ENTWICKLUNG EINES ON-LINE-SPE-VERFAHRENS.....	18
4.1 Auswahl der Analyten.....	18

4.2 Herstellung der Meßlösungen	19
4.3 Verwendete Apparatur	19
4.3.1 Anreicherung der Analyten	20
4.3.2 Analyse	21
5 OPTIMIERUNG DES VERFAHRENS	23
5.1 Wahl des geeigneten Elutionsmittels	23
5.2 Entwicklung eines Gradientenprogramms.....	26
5.3 Optimierung des pH-Werts der Wasserprobe	31
5.4 Optimierung weiterer Parameter	34
5.4.1 Fließrate der Wasserprobe	34
5.4.2 Konditionierung.....	35
5.4.3 Temperatur und Fließrate bei der chromatographischen Trennung	35
6 VALIDIERUNG DES VERFAHRENS.....	37
6.1 Wiederfindungsraten und Wiederholgenauigkeit.....	37
6.2 Bestimmung der Durchbruchsvolumina	40
6.3 Kalibrierung zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen.....	44
6.4 Arbeitsbereich	47
7 VERGLEICH MIT ANDEREN VERFAHREN	50
7.1 Off-line SPE.....	50
7.1.1 Allgemeine Vorgehensweise.....	50
7.1.2 Durchbruchsvolumina.....	50
7.1.3 Kalibrierung	52
7.2 On-line SPE mit PRP-1-Vorsäulen	54
8 PENTAFLUORBENZYLIERUNG AMPHOTERER AROMATISCHER AMINE	60
8.1 Reaktionsverlauf	60
8.2 Auswahl der Analyten	61
8.3 Herstellung der Standardlösungen	62
8.4 Vorläufige Durchführung der Derivatisierung	63

8.5 Gaschromatographische Trennung der Derivate.....	63
8.5.1 Verwendete Apparatur.....	63
8.5.2 Verwendete Temperaturprogramme.....	64
9 OPTIMIERUNG DES VERFAHRENS	68
9.1 Wahl des Lösungsmittels.....	68
9.2 Zugabe von Pentafluorbenzylbromid	69
9.3 Auswahl der Base	71
9.4 Zugabemenge der Base	72
9.5 Zugabe von Kronenether	73
9.6 Reaktionszeit und Temperatur	74
9.7 Extraktion.....	76
9.8 Optimierte Durchführung der Derivatisierung.....	77
9.9 Beeinflussung der Reaktionsausbeute durch Wasser	77
10 BESTIMMUNG VON VERFAHRENSPARAMETERN	79
10.1 Massenspektrometrische Untersuchung der Derivate	79
10.2 Kalibrierung des Verfahrens zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen.....	81
10.2.1 Aminobenzoesäuren	81
10.2.2 Aminophenole	83
11 IODIERUNG DER PENTAFLUORBENZYLDERIVATE.....	85
11.1 Allgemeines.....	85
11.2 Vorläufige Durchführung der Iodierung.....	86
11.3 Gaschromatographische Trennung der Derivate.....	86
11.3.1 Trennung der iodierten Aminobenzoesäurederivate.....	86
11.3.2 Trennung der iodierten Aminophenolderivate	88
11.4 Optimierung der Versuchsbedingungen.....	90
11.4.1 Zugabemenge an Iodwasserstoffsäure	90
11.4.2 Extraktion.....	91
11.4.3 Verkürzung der Reaktionszeit nach Amidosulfonsäurezugabe	92

11.5 Massenspektrometrische Untersuchung der Derivate	93
11.6 Kalibrierung und Bestimmungsgrenzen.....	95
11.6.1 Aminobenzoesäuren	95
11.6.2 Aminophenole	97
12 DISKUSSION.....	99
12.1 On-line-SPE/HPLC mit HR-P-Phasen	99
12.2 Vergleich mit anderen Verfahren	100
12.3 Pentafluorbenzylierung amphoterer aromatischer Amine.....	102
12.4 Iodierung der Pentafluorbenzylderivate	103
13 ZUSAMMENFASSUNG	105
14 LITERATURVERZEICHNIS.....	107
15 ANHANG	121
15.1 Geräte	121
15.2 Chemikalien	122
15.2.1 Referenzsubstanzen	122
15.2.2 Weitere Chemikalien	124
15.2.3 Festphasen	124
15.2.4 Lösungen.....	125
15.3 Optimierte Verfahren.....	125
15.3.1 On-line-SPE	125
15.3.2 Optimierte Durchführung der Pentafluorbenzylierung.....	126
15.3.3 Optimierte Durchführung der Iodierung	126
Danksagung	128

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau des Säulenschaltssystems, Ventilstellung „load“	21
Abb. 2: Schematischer Aufbau des Säulenschaltssystems, Ventilstellung „inject“	22
Abb. 3: Chromatogrammvergleich zur Auswahl des geeigneten Eluenten, HPLC-SG 2.....	25
Abb. 4: Chromatogramme zum Vergleich von On-line-SPE und direkter Injektion	27
Abb. 5: Chromatogramme des HPLC-SG 1 nach On-line-SPE-HPLC, 210 und 230 nm.....	30
Abb. 6: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten von pH-Wert der Wasserprobe	34
Abb. 7: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten von der Fließrate	35
Abb. 8: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten vom Anreicherungsvolumen bei Online-SPE	42
Abb. 9: Chromatogrammvergleich bei unterschiedlichen Anreicherungsvolumina, HR-P- Vorsäule	43
Abb. 10: Kalibriergrade für 3,5DNA nach Anreicherung von 50 mL Wasserprobe.....	47
Abb. 11: Kalibriergerade für 2,4DA6NT zur Bestimmung des linearen Arbeitsbereichs	48
Abb. 12: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten vom Anreicherungsvolumen bei Off-line- SPE	51
Abb. 13: Kalibriergerade für 3,5DNA nach Off-line-SPE.....	54
Abb. 14: Chromatogrammvergleich bei unterschiedlichen Anreicherungsvolumina, PRP-1- Vorsäule	58
Abb. 15: Schema der Pentafluorbenzylierung amphoterer aromatischer Amine	60
Abb. 16: Chromatogrammausschnitt der ABS-Derivate nach Pentafluorbenzylierung	65
Abb. 17: Chromatogrammausschnitt der AP-Derivate nach Pentafluorbenzylierung	67
Abb. 18: Auswahl des geeigneten Lösungsmittels	69
Abb. 19: Abhängigkeit der Peakflächen von der Zugabevolumen an PFBBr.....	70
Abb. 20: Auswahl einer geeigneten Base.....	72
Abb. 21: Bestimmung der Zugabemenge an Kaliumcarbonat	73
Abb. 22: Einfluß des Zugabevolumens von 18-Krone-6-Lösung auf die Derivatisierung	74
Abb. 23: Einfluß von Temperatur und Reaktionszeit am Beispiel von 2ABS	75
Abb. 24: Einfluß von Wasser auf die Derivatisierungsreaktion	78
Abb. 25: Massenspektrum des Pentafluorbenzylderivats von 2ABS	79
Abb. 26. Massenspektrum des Pentafluorbenzylderivats von 4A2NP	80
Abb. 27: Kalibriergerade für 3-Aminophenol nach Pentafluorbenzylierung	84
Abb. 28: Reaktionsschema der Derivatisierung aromatischer Amine mit Iod.....	85

Abb. 29: Chromatogrammvergleich der Aminobenzoessäurederivate.....	87
Abb. 30: Chromatogrammvergleich der Aminophenolderivate	89
Abb. 31: Abhängigkeit der Peakflächen von der Zugabemenge an HI	91
Abb. 32: Massenspektrum des iodierten Pentafluorbenzylderivats von 2ABS	93
Abb. 33: Massenspektrum des iodierten Pentafluorbenzylderivats von 3AP	94
Abb. 34: Kalibriergerade für 2A4NBS nach Pentafluorbenzylierung und Iodierung	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ausgewählte Analyten mit Abkürzung, CAS-Bezeichnung und CAS-Nr.....	18
Tab. 2: HPLC-Standardgemisch 1, Zusammensetzung und Konzentrationen.....	19
Tab. 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Purospher [®] RP-18e.....	20
Tab. 4: Pumpenprogramm (P1) zur Anreicherung von 50 mL Wasserprobe.....	24
Tab. 5: Halbwertsbreiten nach On-line-SPE/HPLC und direkter Injektion.....	28
Tab. 6: Optimiertes Gradientenprogramm (P2) zur HPLC-Analyse.....	29
Tab. 7: Retentionszeiten und UV-Daten.....	31
Tab. 8: Abhängigkeit der Wiederfindungsrate vom pH-Wert der Wasserprobe.....	33
Tab. 9: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser.....	38
Tab. 10: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser.....	39
Tab. 11: Untersuchte Anreicherungs volumina und Konzentrationen der Wasserproben.....	41
Tab. 12: Durchbruchsvolumina bei On-line-SPE mit HR-P-Vorsäulen.....	42
Tab. 13: Zuordnung der Peaknummern nach On-line-SPE/HPLC mit HR-P-Festphasen.....	44
Tab. 14: Kenndaten der Kalibrierung zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen.....	46
Tab. 15: Kenndaten der Kalibrierung zur Ermittlung des linearen Arbeitsbereichs.....	49
Tab. 16: Wiederfindungsraten und Durchbruchsvolumina nach Off-line-SPE.....	52
Tab. 17: Kenndaten der Kalibrierung und Bestimmungsgrenzen.....	53
Tab. 18: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser.....	55
Tab. 19: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser.....	57
Tab. 20: Zuordnung der Peaknummern nach On-line-SPE/HPLC mit PRP-1-Festphasen.....	59
Tab. 21: Ausgewählte Analyten mit Abkürzungen und pK _S -Werten.....	61
Tab. 22: GC-SG S, Zusammensetzung und Konzentrationen.....	62
Tab. 23 : GC-SG P, Zusammensetzung und Konzentrationen.....	63
Tab. 24: Spezifikation der verwendeten DB 5-Säule.....	64
Tab. 25: Temperaturprogramm 1, Trennung der Aminobenzoessäurederivate.....	64
Tab. 26: Retentionszeiten und Peak-Nr. der ABS-Derivate, Temperaturprogramm 1.....	66
Tab. 27: Temperaturprogramm 2, Trennung der Aminophenolderivate.....	66
Tab. 28: Retentionszeiten und Peak-Nr. der AP-Derivate, Temperaturprogramm 2.....	67
Tab. 29: Extraktionsraten der Pentafluorbenzyllderivate.....	76
Tab. 30: MS-Daten für pentafluorbenzylierte amphotere aromatische Amine.....	81
Tab. 31: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der ABS nach Pentafluorbenzylierung.....	82
Tab. 32: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der AP nach Pentafluorbenzylierung.....	83

Tab. 33: Retentionszeiten und Peak-Nr. der ABS-Derivate.....	88
Tab. 34: Temperaturprogramm 3, Trennung der iodierten Aminophenolderivate	88
Tab. 35: Retentionszeiten und Peak-Nr. der AP-Derivate	90
Tab. 36: Extraktionsraten der iodierten Pentafluorbenzyllderivate	92
Tab. 37: MS-Daten der iodierten pentafluorbenzylierten amphoteren aromatischen.....	95
Tab. 38: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der ABS nach Pentafluorbenzylierung	96
Tab. 39: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der AP nach Pentafluorbenzylierung und	98
Tab. 40: Vergleich der Wiederfindungsraten in bidest. Wasser.....	101
Tab. 41: Standardsubstanzen mit CAS-Nr., Bezugsquelle und Gefahrensymbolen.....	123
Tab. 42: Verwendete Chemikalien mit Bezugsquellen und Reinheitsgrad.....	124

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

bidest.	zweifach destilliert
c	Konzentration
DAD	Diodenarraydetektor
d _f	Filmdicke in GC-Säulen
ECD	Electron Capture Detector (Elektroneneinfangdetektor)
GC	Gaschromatographie
GCB	Graphitized Carbon Black (graphitierter Kohlenstoff)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
ID	innerer Durchmesser
λ	Meßwellenlänge
LLE	Liquid-liquid extraction
M ⁺ -Peak	Massenfragment, das die Masse des Radikalkations des Moleküls aufweist
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
n.n.	nicht nachweisbar
PS-DVB	Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymer
SPE	Solid-phase extraction (Festphasenextraktion)
s _{rel.}	relative Standardabweichung
s _x	Verfahrensstandardabweichung
t _R	Retentionszeit
V _k	Variationskoeffizient
WDF	Wiederfindungsrate
X _B	Bestimmungsgrenze

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Aromatische Amine (Aniline) kommen in zahlreichen chemischen Prozessen zum Einsatz. Einige Verbindungen werden direkt als Pharmazeutika (1), als Haarfärbemittel (2) oder als Herbizide (3, 4) verwendet. Ein Großteil der Verbindungen entsteht bei der Herstellung von Farbstoffen, Pflanzenschutzmitteln (PSM), Kunststoffen und Pharmazeutika oder wird dort eingesetzt (5).

Durch ihren vielfältigen Einsatz in der Industrie kommt es zum Eintrag aromatischer Amine in die aquatische Umwelt. Eine weitere Quelle für die Kontamination mit Anilinen ist der mikrobielle Abbau anderer Verbindungen wie PSM (3,6), Azofarbstoffe (7-9) und Nitroaromaten (8, 10-12). Bei letzteren handelt es sich vorwiegend um Sprengstoffe oder um Nebenprodukte aus deren Herstellung. So wurde auf den Arealen ehemaliger Rüstungsfabriken eine Vielzahl aromatischer Amine als Kontaminanten in Böden und Sickerwässern nachgewiesen (13-15).

Viele Aniline sind toxisch (5), einige besitzen ein mutagenes oder carcinogenes Potential (16). Der EU-Grenzwert für aromatische Amine in Trinkwasser beträgt 1,0 µg/L für die Summe der Verbindungen beziehungsweise 0,5 µg/L für Einzelsubstanzen (17). Der Grenzwert für die Konzentration toxischer Abbauprodukte von Pestiziden liegt nach der Trinkwasserverordnung bei 0,1 µg/L für Einzelsubstanzen und bei 0,5 µg/L für die Summe dieser Verbindungen (18). Das Bundesgesundheitsamt hat im Rahmen der Überwachung des auf dem Gelände der Rüstungsaltpast in Stadtallendorf/Hessen geförderten Trinkwassers einen Grenzwert von 0,1 µg/L für die Summe der diazotierbaren aromatischen Amine festgelegt, siehe (19).

Für die Überwachung der oben genannten Grenzwerte und eine toxikologische Bewertung von Wasserproben ist der Einzelnachweis der Aniline erforderlich, insbesondere im Hinblick auf das carcinogene Potential einiger Substanzen. Es besteht daher die Notwendigkeit zur Entwicklung empfindlicher Nachweismethoden für diese Verbindungen.

Ein Problem, das bei dem Nachweis der Aniline in wässrigen Proben auftritt, ist ihre sehr gute Wasserlöslichkeit. Diese erschwert die Anreicherung der Analyten aus der wässrigen Phase, die lange Zeit durch Einengen der wässrigen Probe im Vakuum oder durch Flüssig-flüssig-

Extraktion durchgeführt wurde. Diese Verfahren weisen jedoch Nachteile wie einen hohen Zeitaufwand bzw. Lösungsmittelverbrauch auf. In den letzten Jahren wurden im Arbeitskreis STORK einige Arbeiten zur Festphasenextraktion (SPE) aromatischer Amine durchgeführt (20-21). Die Verwendung eines hochgradig vernetzten Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymers (PS-DVB) im Off-line-Modus erwies sich dabei für basische Aniline als sehr gut geeignet (22).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Anreicherungsverfahren mit dem dort verwendeten Sorbens auf den On-line-Betrieb zu übertragen und mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) zu koppeln und somit die Bestimmung aromatischer Amine mittels On-line-SPE/HPLC zu untersuchen.

Neben der HPLC bietet die Gaschromatographie (GC) eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung aromatischer Amine. Die direkte Bestimmung aromatischer Amine mittels GC mit Elektroneneinfangdetektor (ECD) bereitet aufgrund mangelnder Flüchtigkeit, häufig auftretenden Peaktailings und mangelnder Empfindlichkeit des Detektors für diese Substanzen Schwierigkeiten. In vorhergehenden Arbeiten wurde ein Derivatisierungsverfahren entwickelt, das die gaschromatographische Bestimmung basischer Aniline ermöglicht (22). Gleichzeitig wird eine sehr empfindliche Detektion mittels ECD ermöglicht. Bei der Untersuchung amphoterer aromatischer Amine wie Aminobenzoesäuren oder Aminophenolen führte dieses Verfahren jedoch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen.

Aus diesem Grund sollte ein weiteres Derivatisierungsverfahren für amphotere aromatische Amine entwickelt werden. Um die Detektorempfindlichkeit zu erhöhen, sollten elektronenziehende Substituenten wie Halogene in die Analyten eingebracht werden. Die Derivatisierung sollte möglichst unkompliziert durchzuführen sein und keinen völligen Wasserausschluß erfordern. Für die massenspektrometrische Untersuchung der Derivate war zudem die Bildung charakteristischer Fragmente wünschenswert.

2 Aromatische Amine

2.1 Eigenschaften und Vorkommen in wässrigen Umweltproben

Eine wesentliche Eigenschaft der aromatischen Amine ist ihre hohe Wasserlöslichkeit. Für Anilin beträgt diese 34 g/L (23). Die Mobilität der Aniline ist daher hoch, weshalb ein schnelles Eindringen in das Grundwasser ermöglicht wird. Dies gilt auch für etwas weniger polare, substituierte Verbindungen (24). Die Aminogruppe ist zudem in der Lage, über kovalente Bindungen an Huminstoffe (25) und über Ionenaustauscherprozesse mit Tonmineralien (26) feste Bindungen im Boden einzugehen. Eine Beurteilung der Grundwassergefährdung durch aromatische Amine ist daher schwierig.

Neben den basischen Anilinen existieren amphotere Verbindungen, die zusätzlich saure Substituenten wie Hydroxyl- oder Carboxylgruppen besitzen. Je nach pH-Wert liegen diese in protonierter, deprotonierter oder nicht-ionischer Form vor. Die Bildung von Zwitterionen ist ebenfalls möglich (27).

Eine Reihe aromatischer Amine wurden als akut oder chronisch toxisch (5) eingestuft; einige Verbindungen sind erwiesenermaßen carcinogen (28) oder stehen im Verdacht, es zu sein. Für akut toxische Aniline wurden MAK-Werte festgelegt (29). Für die vermutlich oder erwiesenermaßen krebserzeugenden Verbindungen gibt es keine derartigen Werte, da eine Dosis-Wirkungsbeziehung nicht aufgestellt werden kann. Sie werden nach DFG in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Zur Kategorie III A1 (eindeutig krebserzeugend für den Menschen) werden beispielsweise 2-Naphthylamin und 4-Aminobiphenyl gezählt. 2-Amino-4-nitrotoluol und 4-Chloranilin wurden in der Klasse III A2 als "Stoffe, die sich bislang nach Meinung der Kommission nur im Tierversuch als eindeutig krebserzeugend erwiesen haben" eingestuft. Zu den Stoffen mit begründetem Verdacht auf krebserzeugendes Potential (Klasse III B) gehören beispielsweise Anilin und 4-Aminotoluol. Eine zusätzliche Gefährdung besteht durch die Mutagenität einiger Aniline, die bei verschiedenen Toxizitätsuntersuchungen festgestellt wurde (30). Dazu gehören unter anderem 2,6-Diaminotoluol, 4-Aminophenol (31) und 2-Amino-4-nitrophenol (32).

Andererseits handelt es sich bei 4-Aminobenzoesäure um das Vitamin B_x (33), das für einige Organismen zum Aufbau des B-Vitamins Folsäure lebenswichtig ist und somit keinesfalls als gefährlich einzustufen ist. Die bloße Anwesenheit einer Aminogruppe erlaubt also noch keine toxikologische Bewertung.

In den letzten Jahren wurden wäßrige Umweltproben unterschiedlicher Herkunft auf die Anwesenheit aromatischer Amine untersucht. Sowohl im Rheinwasser (34) als auch in der Elbe (35) wurden zahlreiche Aniline im Konzentrationsbereich von 0,1 bis zu einigen µg/L gefunden. Es handelte sich hierbei teilweise um Chloraniline wie 4-Chloranilin, 3,4-Dichloranilin und 2,4,5-Trichloranilin (36), aber auch Amino-nitroaniline. In verschiedenen Oberflächen- und Abwässern wurde eine Vielzahl von Anilinen gefunden, wobei es sich zum größten Teil um chlorierte Verbindungen handelte (37, 38).

Auf dem Gelände eines ehemaligen Gaswerks wurden in Grundwasserproben verschiedene Dimethylaniline und weitere Verbindungen wie Anilin, 4-Aminobiphenyl und Naphthylamin im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 250 µg/L gefunden (39).

Für den Bereich ehemaliger Rüstungsstandorte liegen eine Reihe von Ergebnissen vor (14,22). Bisher wurden zahlreiche aromatische Amine, vor allem als Abbauprodukte von Trinitrotoluol (TNT), bestimmt. Amphotere aromatische Amine wurden bisher in der Umwelt nur selten nachgewiesen (40).

2.2 Analytik aromatischer Amine

2.2.1 Anreicherung

Das Extraktionsverhalten aromatischer Amine ist aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit schlecht. In der Literatur wurde bis vor kurzem meist die Flüssig-flüssig-Extraktion, vorwiegend mit Dichlormethan, zur Anreicherung aromatischer Amine angewandt (34, 41-43). Die Nachteile liegen dabei in einem hohen Lösungsmittelverbrauch und häufig in der Bildung von Emulsionen. Das Einengen der Wasserproben ist dagegen zeit- und energieaufwendig und es ist mit dem Verlust leicht flüchtiger Substanzen zu rechnen.

In letzter Zeit hat sich die Anreicherung aromatischer Amine mittels Festphasenextraktion durchgesetzt (36, 40, 41). Enthalten die Amine keine zusätzlichen sauren Gruppen, kann die Anreicherung nach Einstellen eines basischen pH-Werts an unpolaren Festphasen durchgeführt werden. Festphasen auf der Basis eines Styrol-Divinylbenzol-Kopolymers, die in den vergangenen Jahren entwickelt wurden, erwiesen sich als gut geeignet (41). Der Einsatz von Polymeren ist nötig, da Kieselgele bei pH-Werten größer als 8 nicht mehr stabil sind. Gegenüber den häufig verwendeten C₁₈-Phasen besitzen die neu entwickelten Phasen höhere Kapazitäten, was für die Anreicherung größerer Probenvolumina wichtig ist. Neben Festphasen auf Polymerbasis (44) wurden auch Sorbentien auf Kohlenstoffbasis (45) und Kationenaustauscher-Materialien (46) eingesetzt. Die meisten Untersuchungen waren auf Chloraniline ausgerichtet, aber auch polare und amphotere aromatische Amine wurden untersucht, wobei sich die Anreicherung der amphoteren Verbindungen als problematisch erwies (21, 47).

2.2.2 Summenbestimmung aromatischer Amine

Zur Routine-Überwachung des Trinkwassers von Stadtallendorf/Hessen, dem Standort ehemaliger Rüstungsfabriken, wurde Mitte der 70er Jahre von PFEIL in Marburg in Zusammenarbeit mit dem Hygiene-Institut Gelsenskirchen ein Verfahren entwickelt, bei dem aromatische Amine über einen Summenparameter bestimmt werden. Die Amine werden mit Natriumnitrit in salzsaurer Lösung diazotiert und anschließend mit N-1-Naphthylethylendiamin (NEDA) zu Azofarbstoffen umgesetzt. Diese werden bei einer Wellenlänge von 545 nm photometrisch bestimmt. Als Bezugssubstanz wird 4-Nitroanilin verwendet. Dieses Verfahren wird auch in Anlehnung an eine Richtlinie des Bundes-Gesundheitsamtes (19) häufig eingesetzt, um eine Belastung mit aromatischen Aminen zu untersuchen. Bezüglich der Quantifizierung treten jedoch einige Nachteile auf: zum einen reagieren unter den gewählten Bedingungen nicht alle Amine, zum anderen weisen die erfaßten Aniline stark differierende Absorptionskoeffizienten und –maxima auf. Zudem können Matrixbestandteile, die ebenfalls eine Azokupplung eingehen, die Bestimmung stören. Eine toxikologische Bewertung der untersuchten Proben ist aufgrund des fehlenden Einzelstoffnachweises nicht möglich (48).

2.2.3 Bestimmung mit HPLC

Für die Trennung und Bestimmung aromatischer Amine mittels HPLC existieren zahlreiche Beispiele. So wurde die Trennung von Aminophenolen (49), Aminobenzolsulfonsäuren (40), Aminobenzoensäuren (40), Nitroanilinen (50), Diaminotoluolen (41) und Phenylendiaminen (49) beschrieben. Dabei erfolgte die Detektion zumeist mit universell einsetzbaren UV- oder Diodenarray-Detektoren (DAD) (40, 41, 50-52). Der Vorteil der Verwendung eines DADs liegt in der kontinuierlichen Spektrenaufnahme, die eine leichtere Identifizierung der Analyten ermöglicht. Der Einsatz eines elektrochemischen Detektors ist ebenfalls bekannt (53,54). Hier werden die Aniline unter Verwendung einer Kohlenstoff-Elektrode im oxidativen Modus nachgewiesen. Weiterhin kann die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor mit (55) oder ohne (56) vorhergehender Derivatisierung erfolgen. Die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (MS) wurde zur Untersuchung von Umweltproben auf aromatische Amine ebenfalls angewendet (57).

2.3.4 Gaschromatographische Bestimmung

Die direkte gaschromatische Bestimmung aromatischer Amine wird durch die hohe Polarität, geringe Flüchtigkeit der Verbindungen und Peaktailing erschwert (58). Aus diesem Grund werden aromatische Amine vor der Bestimmung mit GC meist derivatisiert. Es gibt zahlreiche Derivatisierungsverfahren für aromatische Amine. Dazu zählen die Acylierung mit Carbonsäureanhydriden (43) und -chloriden, Acylimidazolen oder Acylamiden (42) und die Silylierung mit unterschiedlichen Silylierungs-Reagenzien (59). Ein Nachteil dieser Reaktionen liegt in dem notwendigen Wasserausschluß, um die Hydrolyse der Reagenzien zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung aromatischer Amine ist die Bromierung des aromatischen Rings in saurem Medium (34, 60). Die Aminogruppen bleiben hierbei erhalten. Abhängig von der weiteren Substitution des jeweiligen Aromaten kommt es zur Bildung mono- bis tri-bromierter Derivate. Diese Reaktion ist einfach durchzuführen und erfordert keinen völligen Wasserausschluß, was eine vorhergehende Probenanreicherung mittels SPE ermöglicht. Bei einem anderen Verfahren, der Iodierung der aromatischen Amine, werden die Aminogruppen nach einer Diazotierung in einer SANDMEYER-ähnlichen Reaktion durch Iod substituiert (22). Diese Reaktion kann direkt im wäßrigen Medium durchgeführt werden und ist einfach zu handhaben. Der Nachweis der Derivate erfolgt

meistens mit Hilfe eines ECDs oder massenspektrometrisch (6, 43). Es wurden jedoch auch andere Detektoren verwendet (61, 62).

2.2.4 Trennung mit weiteren Verfahren

Neben den herkömmlichen Trennverfahren wurden auch kapillarelektrophoretische Verfahren zur Bestimmung von Anilinen eingesetzt (47, 63). Ein Nachteil liegt dabei in der geringen Konzentrationsempfindlichkeit dieser Methoden. Für die Analyse amphoterer Aniline mittels Mizellarer Elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) wurde ein Verfahren entwickelt, wobei die Aniline zuvor mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC-Cl) derivatisiert wurden (64). Im Vergleich zu der Bestimmung dieser Derivate mittels HPLC liegen die Nachweisgrenzen jedoch höher. Der Vorteil dieses Verfahrens ist im geringeren Zeitaufwand anzusehen.

Dünnschicht-Chromatographie (DC) wurde für die Analytik von Farbstoffen und deren Abbauprodukten eingesetzt (65, 66). Für die Bestimmung von Naphthylaminen und Benzidin in Trinkwasser (67) sowie die Trennung von Nitrotoluidinen in Wasserproben aus ehemaligen Rüstungsaltslasten wurde ebenfalls DC verwendet (68).

3 Festphasen-Extraktion

3.1 Allgemeines

Bei der Bestimmung organischer Substanzen in Wasser ist die Anreicherung der Analyten, häufig verbunden mit der Abtrennung störender Matrixbestandteile, ein wichtiger Schritt. Wurde dazu früher meist die Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE) eingesetzt, hat sich in den letzten Jahren vermehrt die Festphasen-Extraktion durchgesetzt. Auch bei der Untersuchung biologischer Proben hat sich die SPE etabliert. Zahlreiche Veröffentlichungen mit Anwendungen, wie auch einige Übersichtsartikel sind bisher erschienen (69-72). Die Vorteile der SPE gegenüber der LLE liegen in der Verringerung des Lösungsmittelverbrauchs, kürzerer Probenvorbereitungszeit und leichter Automatisierbarkeit (73). Die Bildung von Emulsionen, verbunden mit einer erschwerten Phasentrennung ist ein weiterer Nachteil der LLE. Zudem lassen sich vor allem polare Verbindungen mittels LLE nur schwer beziehungsweise gar nicht aus der wässrigen Phase extrahieren. Die Anreicherung besonders polarer Substanzen stellt auch für die SPE ein Problem dar.

Die SPE basiert wie auch die HPLC auf Migrationsprozessen, bei denen die Komponenten adsorbiert und eluiert werden, während sie in einer mobilen Phase durch ein poröses Medium fließen. Die Retention entsteht durch starke, reversible Wechselwirkungen zwischen Analyt-Molekül und Sorbensoberfläche. Typische Wechselwirkungen sind hydrophobe (Van der Waals-Kräfte), polare (Wasserstoff-Brücken-Bindung und Dipol-Dipol-Kräfte) oder ionische Wechselwirkungen. Die bei der SPE auftretenden Prozesse sind während des Extraktionsschrittes mit der Frontal-Chromatographie und während des Elutionsschrittes mit der Verdrängungschromatographie zu vergleichen.

Vor der Auswahl eines Sorbens für die SPE ist es notwendig, physiko-chemische Überlegungen über die funktionellen Gruppen der Analyten, die Natur der gebundenen Phase sowie über die Wechselwirkungen zwischen Analyten und Sorbens, zwischen Sorbens und Komponenten der Matrix und zwischen Analyten und Matrix anzustellen. Neben dem Hauptziel, der Extraktion der Analyten mit Konzentrationen im Spurenbereich aus der zu untersuchenden Probe, wird die SPE auch verwendet, um störende Matrixkomponenten zu entfernen. Weiterhin wird die SPE von einigen Autoren gezielt dazu benutzt, das Lösungsmittel zu wechseln (zum Beispiel von wässrigem zu organischem Lösungsmittel).

Barceló et al. konnten darüber hinaus zeigen, daß mit Analyten beladene Kartuschen verlustfrei über längere Zeit gelagert werden können. Dies ermöglicht eine Vorortanreicherung und einen stark vereinfachten Transport der Proben (74).

Typische SPE-Materialien sind mit C₈, C₁₈, CN oder anderen organischen Resten modifizierte Silica-Gele, graphitierter Kohlenstoff und Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymere (PS-DVB). Die problematischsten Substanzen sind polare Analyten, deren Durchbruchvolumina bei den meisten Sorbentien niedrig sind. In den letzten Jahren wurden deshalb neue funktionalisierte polymere Sorbentien und stark quervernetzte Polymere zur Anreicherung polarer Substanzen im Spurenbereich entwickelt. Diese haben eine größere Kapazität als die geläufigen Sorbentien.

3.2 SPE-Verfahren

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Festphasenextraktion kann in vier Hauptschritte unterteilt werden (75):

Konditionierung des Sorbens

Die Konditionierung des Sorbens ist nötig, damit dieses mit dem Analyten eine reproduzierbare Wechselwirkung eingehen kann. Die Konditionierung, auch Solvatisierung genannt, stellt eine Benetzung des Sorbens dar und schafft eine Umgebung, die geeignet zur Adsorption des Analyten ist. Unpolare Sorbentien konditioniert man üblicherweise mit einem Lösungsmittel, das mit Wasser mischbar ist, gefolgt von dem Lösungsmittel, in dem der Analyt gelöst ist (reine Matrix). Polare Sorbentien werden mit unpolaren Lösungsmitteln konditioniert.

Aufgabe der Probe

Die Probenaufgabe kann durch positiven oder negativen Druck erfolgen. Die Fließrate sollte bei höchstens 10 mL/min liegen und hängt von der Art des Sorbens ab.

Waschen des Sorbens

Das Waschen des Sorbens wird üblicherweise mit einer Waschlösung, bei wäßrigen Proben meist mit Wasser, vorgenommen und dient zur Entfernung von Interferenzen. Ist

der Polaritätssprung von Waschlösung zu Eluent zu hoch oder sind beide nicht miteinander mischbar, ist ein Trocknen der Kartuschen nach dem Waschen empfehlenswert. Dieser Schritt sollte jedoch nicht zu lange dauern, um den Verlust flüchtiger Verbindungen zu vermeiden.

Elution

Die Elution mit einem geeigneten Eluenten sollte nicht zu schnell erfolgen. Die Elutionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Säulendimension und der Sorbensmenge (ca. 1 mL/min).

Die meist verwendete Bauart für SPE ist die Kartusche. Verschiedene Arten von Sorbentien werden in unterschiedlicher Menge zwischen zwei Polyethylen- oder Edelstahlfritten in Glas- oder Polypropylen-Kartuschen gepackt, die unterschiedliche Volumina haben können.

Eine andere Bauart, die in den letzten Jahren auf den Markt kam, ist die Extraktions-Disk. Mittlerweile sind zwei unterschiedliche Arten von Disks erhältlich: die „Particle-loaded membrane disks“ (PLMDs) und „Particle embedded glass fibre disks“ (PEGFDs). Erstere werden häufiger eingesetzt. PLMDs bestehen aus einem Netz aus Polytetrafluorethylen-Fasern, in dem die Sorbensteilchen mit einem Durchmesser von ca. 8 μm suspendiert sind. Die Membranen haben eine homogene und flexible Struktur. Die PEGFDs enthalten Sorbensteilchen, die in eine glasfaservernetzte Matrix eingebettet sind.

Die Kartuschenform bringt bei der Wasseranalyse einige Nachteile mit sich. Der Durchgangsquerschnitt ist klein, weshalb die Probenförderraten deutlich geringer sind. Die Gefahr der Verstopfung durch Partikel und adsorbierte Matrixkomponenten ist groß und mögliche Kanalbildung reduziert die Kapazität. Einige dieser Probleme könnten durch die Verwendung von Extraktions-Disks beseitigt werden (76). Trotzdem ist die Kartuschenform immer noch die meist verwendete, vor allem weil nur eine begrenzte Zahl an Sorbentien in Disks erhältlich ist. Normalerweise wird bei Kartuschen ein kleineres Elutionsvolumen benötigt als bei Disks (77).

"Empore"-Disks, die C_{18} oder PS-DVB enthalten, sind die zwei häufigsten Disk-Typen. Einer der Nachteile, der beim Austausch von Kartuschen durch Disks auftritt, ist die Verringerung

der Durchbruchsvolumina bei polaren Substanzen. Deshalb werden Disks meist verwendet, wenn starke Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens bestehen.

3.3 Häufig verwendete Sorbentien für die Festphasenextraktion

3.3.1 Modifizierte Kieselgele

Häufig verwendete Sorbentien auf Kieselgel-Basis sind Oktyl (C₈), Oktadecyl (C₁₈), Ethyl (C₂), Butyl (C₄), Phenyl, Cyclohexyl (CH) und Cyanopropyl (CN). Es handelt sich hierbei um Reversed-Phase-Sorbentien, die für die Verwendung bei wäßrigen Proben geeignet sind. Die Anreicherung beruht hier auf Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den genannten organischen Resten und den Analyten. Das bei der Anreicherung organischer Substanzen aus wäßrigen Proben am meisten verwendete modifizierte Kieselgel ist das C₁₈-Sorbens, weil dessen Kapazität bei Extraktion polarer Substanzen größer ist als die der übrigen chemisch modifizierten Kieselgele (78).

Modifizierte Kieselgele weisen jedoch einige Nachteile auf. Neben einem begrenzten Durchbruchsvolumen für polare Analyten besitzen sie eine geringe Selektivität und können nur in einem schmalen pH-Bereich eingesetzt werden. Ein weiteres Problem sind freie Silanolgruppen, die neben den hydrophoben Wechselwirkungen sehr starke Wasserstoffbrücken-Bindungen und ionische Wechselwirkungen ausbilden können. Diese können bei der Anreicherung polarer Verbindungen aber auch erwünscht sein.

3.3.2 Ionenaustauscher

Die Wechselwirkungen, die zwischen Analyten und Ionenaustauscher auftreten, beruhen zum Großteil auf elektrostatischer Anziehungskraft (Coulomb'sche Kräfte). Die meisten heute verwendeten Ionenaustauscher bestehen aus einem Polymer-Support, an den die benötigte ionische Gruppe chemisch gebunden ist. Für Anionenaustauscher werden meist quartäre, sekundäre oder primäre Amine verwendet, während bei Kationenaustauschern meist Sulfon- oder Carbonsäuren als funktionelle Gruppen eingesetzt werden.

Verschiedene Aminex-Kationenaustauscher-Sorbentien wurden bereits zur Anreicherung polarer Analyten aus Realproben und Industrieabwässern verwendet (79). Ein neues mit Carbonsäuren funktionalisiertes quervernetztes Polymer wurde für die SPE von 15 unterschiedlich substituierten Anilinen und Lutidinen aus Wasser eingesetzt, die auf dem Sorbens durch einen Kationenaustausch-Mechanismus zurückgehalten wurden. Zusätzlich kommt es hierbei zu π - π -Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Sorbens, die von den ungesättigten Anteilen des Sorbens herrühren. Die polarerer und weniger basischen Aniline wurden jedoch auf diesem Sorbens kaum retardiert (80).

3.3.3 Graphitierter Kohlenstoff

Graphitierter Kohlenstoff (GCB) wird durch das Erhitzen von Ruß in einer inerten Atmosphäre auf 2700-3000 °C hergestellt. Es handelt sich hierbei im wesentlichen um unspezifische und nicht poröse Materialien mit einer Oberfläche von circa 100 m²/g (81). Durch die Anwesenheit positiv geladener chemischer Heterogenitäten auf ihrer Oberfläche können sie sowohl als Umkehrphasen als auch als Anionenaustauscher betrachtet werden (82). Einige kommerziell erhältliche Materialien wie Carbopack, Carbograph 1 und Envi-Carb, sind bei der Analyse verschiedener Verunreinigungen wie Phenolen (83), Pestiziden (81,84) und Tensiden (81) in Trink- und Oberflächenwasser eingesetzt worden. Zwei neuere Sorbentien, Carbograph 4 und Carbograph 5 mit einer Oberfläche von mehr als 100 m²/g zeigten bei einem Vergleich zu Carbopack 1 für die meisten polaren Analyten bessere Wiederfindungsraten (81).

Ein gravierender Nachteil der graphitierten Kohlenstoff-Materialien ist eine ausgeprägte Retention der Analyten bis hin zur irreversiblen Adsorption. Dem soll durch Elution im Rückspül-Modus entgegengewirkt werden. Die mangelnde mechanische Stabilität ist ein weiterer Schwachpunkt. Ein neues Material ist poröser immobilisierter graphitierter Kohlenstoff (PGC), bei dem Graphit auf einer Silica-Struktur immobilisiert ist, und das deshalb eine höhere Stabilität aufweist. Bei einem Vergleich der Anreicherung polarer, phenolischer Verbindungen wies dieses Material jedoch kleinere Durchbruchsvolumina und höhere Nachweisgrenzen als bei Festphasen auf Polymerbasis auf (83).

3.3.4 Polymere Sorbentien

Die am häufigsten verwendeten polymeren Sorbentien sind Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymere, die eine hydrophobe Oberfläche besitzen. Viele bei modifizierten Silicagelen auftretende Nachteile bestehen bei PS-DVB-Sorbentien nicht. Sie weisen eine breite pH-Stabilität auf, was die Flexibilität des Anreicherungsverfahrens erhöht, und enthalten keine störenden Silanolgruppen (85). Außerdem verfügen sie, besonders für polare Verbindungen über ein größeres Retentionsvermögen. Die Ursache hierfür liegt in den π - π -Wechselwirkungen in Verbindung mit der deutlich größeren Oberfläche begründet.

XAD-Sorbentien werden seit längerem zur Extraktion einer Vielzahl organischer Substanzen aus Wasser verwendet. XAD-1, XAD-2 und XAD-4 sind Sorbentien mit sehr hydrophobem Charakter. XAD-7 und XAD-8 sind Acrylester-Sorbentien, die über eine höhere Affinität gegenüber polaren Substanzen verfügen (86). XAD-Sorbentien auf der Basis von PS-DVB haben einige Nachteile wie fehlende Selektivität, geringe Durchbruchsvolumina bei sehr polaren Analyten und erfordern vor ihrem Einsatz eine gründliche Reinigung. Ein weiteres, häufig verwendetes PS-DVB-Kopolymer ist PLRP-S. Dieses Sorbens wurde zur Extraktion organischer Verunreinigungen, wie Phenole und Pestizide, von natürlichen Wässern eingesetzt und zeigte sich dabei effizienter als herkömmliche C_{18} -Festphasen (87). Es weist jedoch dieselben Nachteile auf wie die XAD-Materialien.

In den letzten Jahren wurden chemisch modifizierte Sorbentien entwickelt und zur SPE polarer Verbindungen eingesetzt. Verschiedene polare funktionelle Gruppen wie Acetyl- (84, 88), Hydroxymethyl- (88), Benzoyl- (89) und o-Hydroxybenzoylgruppen (90, 91) wurden in die polaren Sorbentien eingebracht. Diese Materialien besitzen eine ausgezeichnete Hydrophilie und höhere Durchbruchsvolumina als ihre unsubstituierten Analoga (88, 90). Dies ist auf eine Steigerung der Oberflächenpolarität zurückzuführen, die der wässrigen Probe einen besseren Kontakt zur Sorbensoberfläche ermöglicht. Auch beim Vergleich mit anderen Materialien wie PLRP-S, C_{18} und GCB verfügen die modifizierten PS-DVB-Sorbentien über höhere Durchbruchsvolumina für die meisten polaren Analyten (89, 90).

Seit einiger Zeit sind hochgradig vernetzte Polymere wie Envi-Chrom P, LiChrolut EN, Icolute ENV oder Chromabond HR-P kommerziell erhältlich. Diese Materialien besitzen einen höheren Vernetzungsgrad als die XAD-Sorbentien und sind hochgradig porös. Ihre

spezifische Oberfläche ist entscheidend größer und es werden stärkere π - π -Wechselwirkungen zwischen Analyten und Sorbens ermöglicht. Die Durchbruchsvolumina sind daher in der Regel größer als bei der Verwendung von schwächer vernetzten Sorbentien. Dies wurde unter anderem beim Vergleich mit anderen Sorbentien wie GCB und einem funktionalisierten PS-DVB-Material (BondElut PPL) für die Anreicherung von Pestiziden und Phenolen gezeigt (84), wo vor allem für Phenole deutlich größere Wiederfindungsraten erzielt wurden. Bei einem Vergleich der verschiedenen kommerziell erhältlichen Produkte bei der Off-line-SPE aromatischer Amine aus wässrigen Proben erwiesen sich die Chromabond HR-P-Festphasen als am besten geeignet (92).

Die Effizienz der polymeren Sorbentien hängt von verschiedenen physiko-chemischen Parametern wie Korngröße, Oberfläche, Porendurchmesser, Porenvolumen, Vernetzungsgrad und Korngrößenverteilung ab (83). Die bei Verwendung von hochgradig vernetzten Polymeren in der On-Line-SPE im Vergleich zu schwächer vernetzten häufig auftretende Bandenverbreiterung kann minimiert werden, wenn Sorbentien mit einer engen Korngrößenverteilung verwendet werden.

3.3.5 Immunosorbentien

Das Hauptproblem bei der SPE von Oberflächengewässern ist der Mangel an selektiven Sorbentien. Die Probenmatrix ist deshalb schwer zu eliminieren und verursacht einen störendes Untergrundrauschen sowie eine stark ausgeprägte Initialbande, die die Bestimmung früher eluierender Verbindungen erschwert.

In letzter Zeit wurden neue Extraktions-Sorbentien synthetisiert, bei denen reversible und selektive Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen auftreten. Diese Immunosorbentien (IS) genannten Materialien werden zur Extraktion strukturell verwandter Verbindungen hergestellt. Es werden Extrakte erhalten, die frei von störenden Matrixbestandteilen oder interferierenden Verbindungen sind. Bei Verwendung dieser Sorbentien können im Idealfall Extraktion, Spurenanreicherung und Aufreinigung in einem Schritt durchgeführt werden.

Immunosorbentien werden hergestellt, indem die Antikörper kovalent an geeignete Sorbentien gebunden werden. Diese sollen funktionelle Gruppen enthalten, um eine

ausreichende Menge von Antikörpern binden zu können, und hydrophil sein, um unselektive Wechselwirkungen mit den Analyten oder der Probenmatrix zu vermeiden (93-95).

Bisher sind nur wenig Immuno-Sorbentien kommerziell erhältlich, weshalb die Zahl der Analyten, die analysiert werden können, begrenzt ist. Die Kosten liegen aufgrund langer Entwicklungszeiten und niedriger Produktionszahlen vergleichsweise noch sehr hoch.

3.3.6 „Molecular imprinted“ Sorbentien

Eine neuere Technologie, die „molecular imprinting“ genannt wird, führt zu sehr stabilen synthetischen Polymeren, die über selektive molekulare Erkennungsmöglichkeiten verfügen. "Molecular imprinted" Polymere (MIP) werden hergestellt, indem hochgradig vernetzte Polymere in Gegenwart von Molekülen, die als Schablone dienen, synthetisiert werden. Nach Entfernung dieser Moleküle kann das Polymer als selektiv bindendes Material für diese Moleküle oder strukturell eng verwandte Verbindungen dienen. Der Bindungsmechanismus, wird auf die Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen im Polymer und auf die Anwesenheit von form-selektiven Hohlräumen zurückgeführt. Einige dieser Polymere besitzen hohe Selektivitäten und Affinitätskonstanten, die mit natürlich auftretenden Erkennungssystemen, wie monoklonalen Antikörpern, vergleichbar sind. Das macht sie besonders geeignet für die Verwendung als Bestandteil chemischer Sensoren oder um die Selektivität bei der SPE zu erhöhen.

Die MIPs lassen sich hinsichtlich der Kosten und Entwicklungszeit, der Probenkapazität und der Materialbeständigkeit mit den Immunosorbentien vergleichen. Bis zu ihrem routinemäßigen Einsatz muß die Anzahl der einprägbaren Analyten noch erhöht werden, sowie die Probleme, die die Heterogenität der Sorbentien und den Massentransport betreffen gelöst werden (96).

3.4 On-line-SPE

Festphasenextraktion kann im Off-line- und im On-line-Modus betrieben werden. Bei On-line-Verfahren wird meist eine Vorsäule verwendet, die das Extraktionsorbens enthält. Mit einer geeigneten Vorrichtung können jedoch auch Extraktions-Disks eingesetzt werden (97, 98).

Verfahren, die SPE mit HPLC verbinden, werden am häufigsten angewandt, um polare, organische Analyten in Wasserproben zu bestimmen. Eine Kopplung mit Kapillar-Gaschromatographie benötigt meist einen Derivatisierungsschritt, um die Flüchtigkeit der Substanzen zu erhöhen, während Superkritische-Flüssigkeits-Chromatographie (SFC) eine teure Ausstattung und einen zusätzlichen Schritt zum Trocknen des Sorbens vor der Desorption erfordert.

Da On-line-Verfahren keine Probenmanipulation zwischen der Anreicherung und der Analyse erfordern, wird das Risiko von Analytverlusten und Probenkontamination, das bei Off-line-Verfahren besteht, vermieden. Nachweisgrenzen und Präzision können somit verbessert werden. Da das gesamte Elutionsvolumen analysiert wird, kann das Probenvolumen im Vergleich zum Off-line-Verfahren verringert werden. Der Verbrauch an organischem Lösungsmittel ist niedriger und das Potential für eine Automatisierung höher (99). Off-line betriebene SPE bleibt jedoch für die Analyse komplexer Proben sehr nützlich, aufgrund ihrer größeren Flexibilität und angesichts der Tatsache, daß derselbe Extrakt mit unterschiedlichen Methoden analysiert werden kann.

Bei den On-line-Verfahren wird das Sorbens nicht nur im Hinblick auf die Effizienz der Anreicherung der Analyten ausgewählt, sondern auch nach Kompatibilität mit dem Sorbens der analytischen Säule: dieses sollte das gleiche (oder ein höheres) Retentionsvermögen haben wie das Vorsäulenmaterial. Die Vorsäule sollte so klein wie möglich sein, um eine Bandenverbreiterung zu vermeiden (100). Die Bandenverbreiterung kann minimiert werden, wenn ein passender Gradient verwendet wird, der eine Analytkompression am Anfang der analytischen Säule bewirkt (83).

Die Versuchsanordnung kann ebenfalls verändert werden, um das Problem der Bandenverbreiterung zu reduzieren. Dazu werden die Analyten im Rückspül-Modus zunächst mit dem organischen Lösungsmittel der mobilen Phase eluiert und dann beide Lösungsmittel vor dem Erreichen der analytischen Säule gemischt (101). Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung phenolischer Substanzen und Pestizide verwendet. Hierbei wurde jedoch ein stärkerer Matrixeffekt beobachtet, der auf die gesteigerte Solvensstärke zurückzuführen ist.

Wird bei der On-line-SPE von Realproben ein starkes Sorbens verwendet, tritt häufig eine breite Initialbande auf, die auf die Anwesenheit von Huminsäuren zurückzuführen ist. Diese

Bande kann die Bestimmung früh eluierender Substanzen erschweren. Eine Möglichkeit, um dieses Problem zu reduzieren, ist die Behandlung der Probe mit KMnO_4 oder Na_2SO_3 (85) vor der Extraktion.

Die Einsatzmöglichkeiten der On-line-SPE sind vielfältig. Ein Schwerpunkt ist die Untersuchung wässriger Proben auf organische Verunreinigungen im Spurenbereich. Neben verschiedenen Pestiziden (102-107) wurden bisher zum größten Teil polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (108, 109) und Phenole (110-112) mit diesem Verfahren untersucht. Dabei wurden z.T. die unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Sorbentien verwendet (104), teilweise aber auch eigens synthetisierte Materialien eingesetzt. Auch für aromatische Amine wurden Untersuchungen durchgeführt (113). Für chlorierte Aniline wurden unter Verwendung des PRP-1-Sorbens, einem PS-DVB-Kopolymer, Nachweisgrenzen von 15-25 ng/L (500 mL Anreicherungsvolumen) in Trinkwasser festgestellt (114).

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Analyse biologischer Proben wie Blutplasma (115-119). Die Probenvolumina liegen dabei im Bereich von einigen Mikrolitern bis hin zu wenigen Millilitern. Hierbei ist das Hauptziel in der Abtrennung der Analyten von der Probenmatrix zu sehen.

4 Entwicklung eines On-line-SPE-Verfahrens

4.1 Auswahl der Analyten

Um den Anwendungsbereich des Verfahrens über die Untersuchung wäßriger Proben aus Rüstungsaltslasten hinaus zu erweitern, wurde die Wahl der Analyten nicht nur auf die Metaboliten des TNT beschränkt. Es wurden zusätzlich Amine ausgewählt, die zum Teil bereits in wäßrigen Umweltproben gefunden wurden. Teilweise handelt es sich dabei um Abbauprodukte von PSM. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, daß sich die Substanzen hinsichtlich ihrer Polarität und Basizität unterscheiden, um das Extraktionsvermögen der Festphasen für einen weiten Bereich aromatischer Amine beurteilen zu können. Die ausgewählten Analyten, ihre CAS-Nr. und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Ausgewählte Analyten mit Abkürzung, CAS-Bezeichnung und CAS-Nr.

Substanz	Abkürzung	Bezeichnung nach CAS	CAS-Nr.
4-Aminotoluol	4AT	Benzeneamine, 4-methyl-	106-49-0
2,6 -Diaminotoluol	2,6DAT	1,3-Benzenediamine, 2-methyl-	823-40-5
2-Amino-4-nitrotoluol	2A4NT	Benzeneamine, 2-methyl-5-nitro-	99-55-8
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	4A2,6DNT	Benzeneamine, 2-methyl-3,5-dinitro-	3572-78-2
2,4-Diamino-6-nitrotoluol	2,4DA6NT	1,3-Benzenediamine, 4-methyl-5-nitro-	6629-29-4
4-Nitroanilin	4NA	Benzeneamine, 4-nitro-	100-01-6
3,5-Dinitroanilin	3,5DNA	Benzenamine, 3,5-dinitro-	618-87-1
2-Naphthylamin	2NphA	2-Naphthalenamine	91-59-8
4-Aminobiphenyl	4ABPh	[1,1'-Biphenyl]-4-amine	92-67-1
4-Chloranilin	4CIA	Benzeneamine, 4-chloro-	106-47-8
3,4-Dichloranilin	3,4DCIA	Benzeneamine, 3,4-dichloro-	95-76-1
2,4,5-Trichloranilin	2,4,5TCIA	Benzeneamine, 2,4,5-trichloro-	636-30-6

Die Bezeichnung der Substanzen erfolgte nicht nach der IUPAC-Nomenklatur. Die Benennung der Verbindungen ausgehend von Toluol als Grundgerüst ist in der Sprengstoffanalytik üblich, da sich Substitutionsmuster so leichter erkennen lassen.

4.2 Herstellung der Meßlösungen

Zunächst erfolgte die Herstellung von Stammlösungen (SL) der Einzelsubstanzen. Die Bezugsquellen der Verbindungen sind im Anhang (Kap. 15.2) aufgeführt. Dazu wurden jeweils 50 mg der Verbindung in 50 mL-Kolben eingewogen und mit Methanol aufgefüllt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen so jeweils 1 µg/µL.

Zur Optimierung des Verfahrens wurde ein Standardgemisch hergestellt, das mit HPLC-Standardgemisch 1 (HPLC-SG 1) bezeichnet wurde. Die Zusammensetzung und die resultierenden Konzentrationen sind in Tab. 2 aufgeführt. Die angegebenen Volumina an Stammlösung wurden in einen 50 mL-Kolben gegeben und mit Acetonitril aufgefüllt.

Tab. 2: HPLC-Standardgemisch 1, Zusammensetzung und Konzentrationen

Substanz	Volumen an SL / µL	Konz. in HPLC- SG 1 / (µg/mL)	Substanz	Volumen an SL / µL	Konz. in HPLC- SG 1 / (µg/mL)
4AT	50	1,0	3,5DNA	50	1,0
2,6DAT	50	1,0	2NphA	50	1,0
2A4NT	50	1,0	4ABPh	50	1,0
4A2,6DNT	50	1,0	4CIA	50	1,0
2,4DA6NT	50	1,0	3,4DCIA	50	1,0
4NA	50	1,0	2,4,5TCIA	50	1,0

SL: Stammlösung

4.3 Verwendete Apparatur

Die für die folgenden Untersuchungen verwendete Apparatur ist in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Diese bestand aus einer HPLC-Einheit mit Gradientenpumpe (P2), analytischer

Säule (AS) und Dioden-Array-Detektor (DAD) und einer Gradientenpumpe (P1), die zur Konditionierung der Festphase und zur Förderung der Wasserprobe verwendet wurde. Beide Systeme waren über ein elektrisches Schaltventil (ESV) miteinander verbunden. Je nach Ventilstellung konnten die Pumpen P1 oder P2 Lösungsmittel über die SPE-Vorsäule (SPE) leiten.

Als analytische Säule wurde eine Purospher[®] RP-18e-Säule (Fa. Merck) verwendet. Dieses Säulenmaterial wurde vorwiegend für die Umkehrphasen-Chromatographie basischer Substanzen entwickelt, ist aber auch zur Analyse neutraler und schwach saurer Verbindungen geeignet. Die physikalisch-chemischen Daten für dieses Sorbens sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Purospher[®] RP-18e

Partikelgröße	spezifische Oberfläche	spezifisches Porenvolumen	Porendurchmesser
5 µm	500 m ² /g	0,95 mL/g	8 nm

Die verwendete Säule hatte eine Länge von 250 mm mit einem Innendurchmesser von 4 mm.

Als Sorbens für die On-Line-SPE wurde das Chromabond HR-P-Material der Fa. Macherey Nagel ausgewählt. Bei diesem Material handelt es sich um ein Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymer mit einer Oberfläche von 1300 m²/g. Dieses Sorbens wurde in eine HPLC-Vorsäule gepackt und mit Hilfe einer externen Vorsäulenhalterung an das Schaltventil angeschlossen.

4.3.1 Anreicherung der Analyten

Für die Anreicherung der Analyten wurde das Schaltventil in die Stellung „load“ gebracht. Die resultierenden Verbindungen der einzelnen Bauteile sind in Abb. 1 dargestellt.

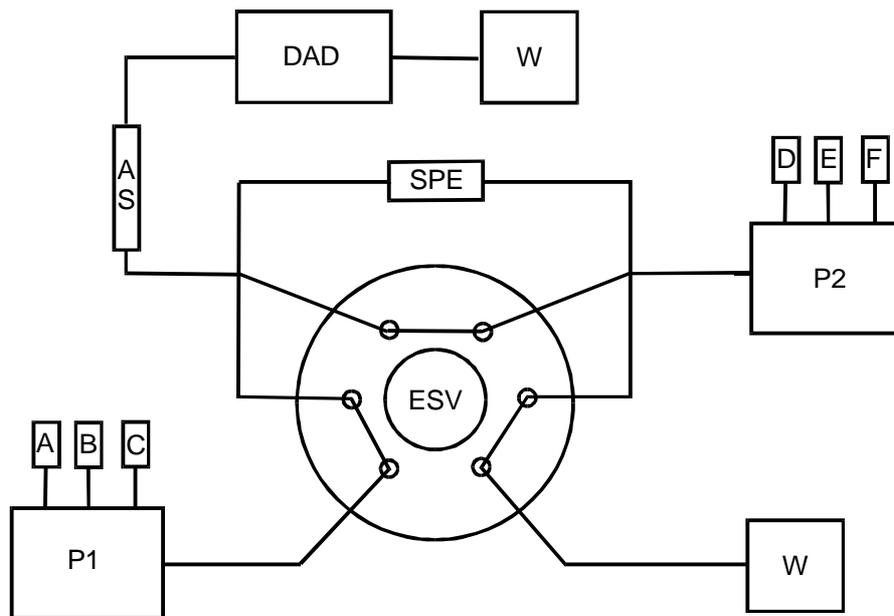


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Säulenschaltsystems, Ventilstellung „load“

A: Wasserprobe; B: Acetonitril; C: Wasser; D: Wasser; E: Acetonitril; F: Puffer; P1: Pumpe 1; P2: Pumpe 2; ESV: Elektronisches Schaltventil; SPE: SPE-Vorsäule; DAD: Dioden-Array-Detektor; AS: Analytische Säule; W: Abfall

Die Anreicherung verlief folgendermaßen:

Zunächst wurde von P1 ein org. Lösungsmittel (hier Acetonitril, B), dann eine definierte Menge an Wasser (C) über die Festphase gepumpt. Danach wurde die zu untersuchende Wasserprobe (A) über die SPE-Vorsäule geleitet. Die Vorsäule wurde anschließend noch mit wenig Wasser gewaschen. Zur gleichen Zeit wurde die analytische Säule mit der verwendeten mobilen Phase (D,E,F) mit Hilfe von P2 konditioniert.

4.3.2 Analyse

Für die Analyse der Analyten mittels HPLC wurde das Schaltventil in die Stellung „inject“ gebracht. Die resultierenden Verbindungen der einzelnen Bauteile sind in Abb. 2 dargestellt.

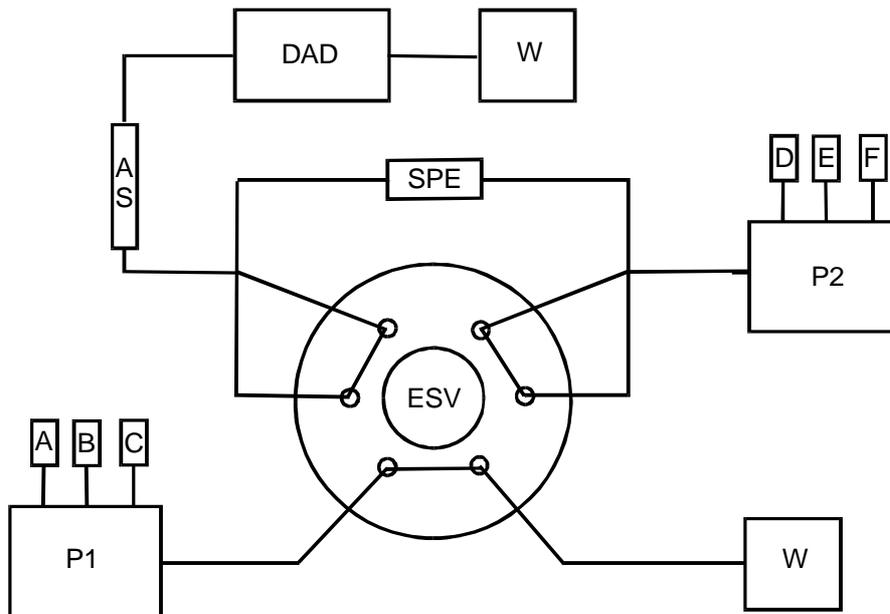


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Säulenschaltsystems, Ventilstellung „inject“

A: Wasserprobe; B: Acetonitril; C: Wasser; D: Wasser; E: Acetonitril; F: Puffer; P1: Pumpe 1; P2: Pumpe 2; ESV: Elektronisches Schaltventil; SPE: SPE-Vorsäule; DAD: Dioden-Array-Detektor; AS: Analytische Säule; W: Abfall

Die Analyten wurden von der mobilen Phase im Rückspül-Modus, d.h. verglichen zur Anreicherung in entgegengesetzter Richtung auf die HPLC-Säule gespült. Dort erfolgte die chromatographische Trennung mit Hilfe eines Gradientenprogramms. Die Detektion geschah mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors, der an eine Computereinheit angeschlossen war. Durch Verwendung einer geeigneten Software erfolgte die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme.

5 Optimierung des Verfahrens

5.1 Wahl des geeigneten Elutionsmittels

In den meisten Veröffentlichungen zur On-line-SPE/HPLC wird zur Elution der angereicherten Substanzen von der SPE-Phase die Lösungsmittelzusammensetzung eingesetzt, die bei der anschließenden chromatographischen Trennung als mobile Phase dient. Bei der Verwendung eines Gradientenprogramms ist dies der Starteluent. Um das für die hier untersuchten Analyten geeignete Elutionsmittel zu finden, wurde der Einfluß verschiedener Elutionsmittelzusammensetzungen auf Form und Größe der erhaltenen Peaks untersucht.

Dazu wurden 100 µL HPLC-Standardgemisch 2 (HPLC-SG 2) mit bidest. Wasser auf 500 mL aufgefüllt ($c = 1 \mu\text{g/L}$, je Analyt) und mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf pH 10,5 eingestellt. Die Zusammensetzung von HPLC-SG 2 entsprach der von HPLC-SG 1, jedoch in fünffach konzentrierterer Form ($c = 5 \mu\text{g/mL}$, je Analyt). Lediglich 2,4,5-Trichloranilin war in diesem Gemisch noch nicht vorhanden. Von der so hergestellten Wasserprobe wurden jeweils 50 mL angereichert. Da aus vorherigen Arbeiten (22) bekannt war, daß sich Methanol, Methanol/Acetonitril und Acetonitril gut zur Elution der aromatischen Amine von HR-P-Phasen eignen, wurden verschiedene Gradientenprogramme mit unterschiedlichen Gehalten an den oben genannten Lösungsmitteln untersucht.

Zur Anreicherung von 50 mL Wasserprobe mit nachfolgender Elution durch ein Acetonitril/Puffer- oder Acetonitril/Wasser-Gemisch wurde das Pumpenprogramm verwendet, das in Tab. 4 aufgeführt ist. Die angegebenen Zeiten bezogen sich auf den Injektionszeitpunkt $t = 0 \text{ min}$. Die Festphase wurde zunächst bei einer Fließrate von 1,0 mL/min mit 7 mL Acetonitril und 5 mL bidest. Wasser konditioniert. Anschließend wurden 50 mL Wasserprobe mit einer Fließrate von 5,0 mL/min über die Festphase geleitet. Danach wurde die Festphase bei einer Fließrate von 1,0 mL/min mit 3 mL bidest. Wasser gewaschen. Bei der Verwendung von Methanol als Elutionsmittel wurden die Festphasen mit Methanol anstelle von Acetonitril konditioniert.

Tab. 4: Pumpenprogramm (P1) zur Anreicherung von 50 mL Wasserprobe

t ^a / min	Fließrate / (mL / min)	Eluentenzusammensetzung		
		P1 (Anreicherung)		
		A / %	B / %	C / %
-25,00	1,0	0	100	0
-18,10	1,0	0	100	0
-18,00	1,0	0	0	100
-13,10	1,0	0	0	100
-13,00	5,0	100	0	0
-03,00	5,0	100	0	0
-02,90	1,0	0	0	100
03,00	1,0	0	0	100

a: bezogen auf Injektionszeitpunkt t = 0 min

A: Wasserprobe

B: Acetonitril

C: Wasser

Folgende Starteluenten wurden untersucht:

- Methanol/Wasser (30/70, v/v)
- [Methanol/Acetonitril (2/1, v/v)]/Wasser (30/70, v/v)
- [Methanol/Acetonitril (1/1, v/v)]/Wasser (30/70, v/v)
- [Methanol/Acetonitril (1/2, v/v)]/Wasser (30/70, v/v)
- Acetonitril/Wasser (30/70, v/v)

In Abb. 3 sind drei mit unterschiedlichen Eluentenzusammensetzungen erhaltene Chromatogramme im selben Maßstab vergleichend dargestellt. Die Chromatogramme wurden unter Verwendung desselben Gradienten aufgenommen.

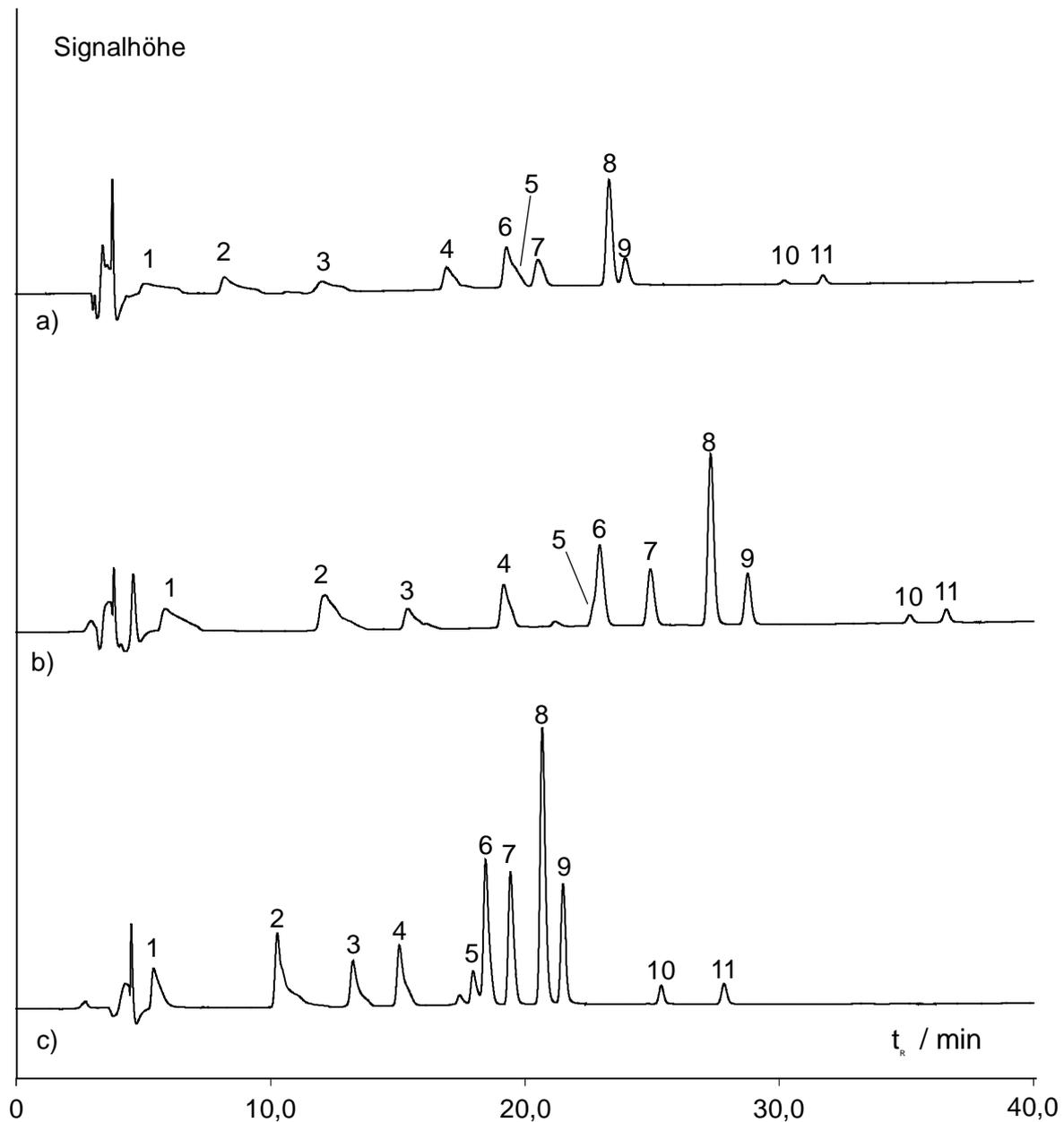


Abb. 3: Chromatogrammvergleich zur Auswahl des geeigneten Eluenten, HPLC-SG 2

a: MeOH/H₂O 30/70; b: [MeOH/MeCN(1:1)]/H₂O 30/70; c: MeCN/H₂O 30/70;
Peakzuordnung s. Tab. 5

Es ist deutlich zu erkennen, daß sich beim Übergang von Methanol zu Acetonitril als organischem Modifier der mobilen Phase die Peakform sichtlich verbesserte. Auch die Größe der erhaltenen Peaks stieg durch die Verwendung von Acetonitril/Wasser als Eluent merklich an. Die Peakzuordnung erfolgte nach Tab. 5 (s. Kapitel 5.2). Die Verschiebung der Retentionsreihenfolge von 4-Chloranilin (5) und 2-Amino-4-nitrotoluol (6) ist in Abb. 3 zwar nur schwer zu beobachten, konnte aber durch Betrachtung der UV-Spektren erkannt werden.

Wie aus vorhergehenden Arbeiten bekannt war, wird für die Elution der aromatischen Amine von der Festphase bei der Verwendung von Methanol ein größeres Volumen an Elutionsmittel benötigt als bei der Elution mit Acetonitril (22). Die Verbindungen werden also langsamer von der Phase eluiert, was im Falle der On-line-SPE/HPLC zu einer verlangsamten Probenaufgabe auf die analytische Säule führt. Die Folge sind Peakverbreiterungen und ein starkes Peaktailing. Da bei dem hier verwendeten Gradientenprogramm das elektronische Schaltventil 2 min nach der Injektion wieder auf „load“ zurückgestellt wurde, war die vollständige Elution der Substanzen von der SPE-Phase bei der Verwendung von Methanol zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt. Dies ist der Grund für die im Vergleich in Abb. 3 beobachtete geringere Peakgröße.

5.2 Entwicklung eines Gradientenprogramms

Nachdem sich bei der Untersuchung der Eluentzusammensetzung gezeigt hatte, daß Acetonitril als Modifier der mobile Phase am besten geeignet war, wurde im folgenden ein Gradientenprogramm entwickelt, das eine effektive Trennung der untersuchten Verbindungen ermöglichen sollte. Dabei war darauf zu achten, daß der Anfangsgehalt an Acetonitril möglichst hoch war, um eine rasche Elution der Analyten von der Festphase zu gewährleisten. Ein zu hoher Acetonitril-Anteil wirkte sich jedoch nachteilig auf die chromatographische Trennung aus, da dies ein Überlappen besonders der zuerst eluierten Substanzen zur Folge hatte. Wie in Abb. 3 ebenfalls zu erkennen ist, kam es auch bei Verwendung von Acetonitril/Wasser als Eluent bei den früh eluierten Verbindungen zu einem ausgeprägten Peaktailing. Dieses Tailing galt es möglichst zu minimieren.

Mehrere Gradientenprogramme wurden verwendet. Der Anfangsgehalt an Acetonitril variierte dabei von 20 bis 40 %. Da in vorhergegangenen Arbeiten zur Trennung aromatischer Amine mittels HPLC ein Methanol/Phosphatpuffer-Gemisch verwendet wurde (22), wurde untersucht, ob der Ersatz des bidest. Wassers durch einen Phosphat-Puffer (je 15 mmol NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 in 1 L Wasser, pH 7,2) eine Verbesserung der Trennung bewirkt.

Als beste Ausgangszusammensetzung für die mobile Phase erwies sich ein Acetonitril/Phosphatpuffer-Gemisch im Verhältnis 28/72. In Abb. 4 ist ein Chromatogramm, das nach der Anreicherung von 50 mL einer Wasserprobe, die HPLC-SG 2 ($c = 1 \mu\text{g/L}$)

enthielt, aufgezeichnet wurde im Vergleich zu einem Chromatogramm, das nach direkter Einspritzung (20 μL) des Gemischs in passender Konzentration dargestellt. Beide Chromatogramme wurden mit demselben Gradientenprogramm aufgenommen.

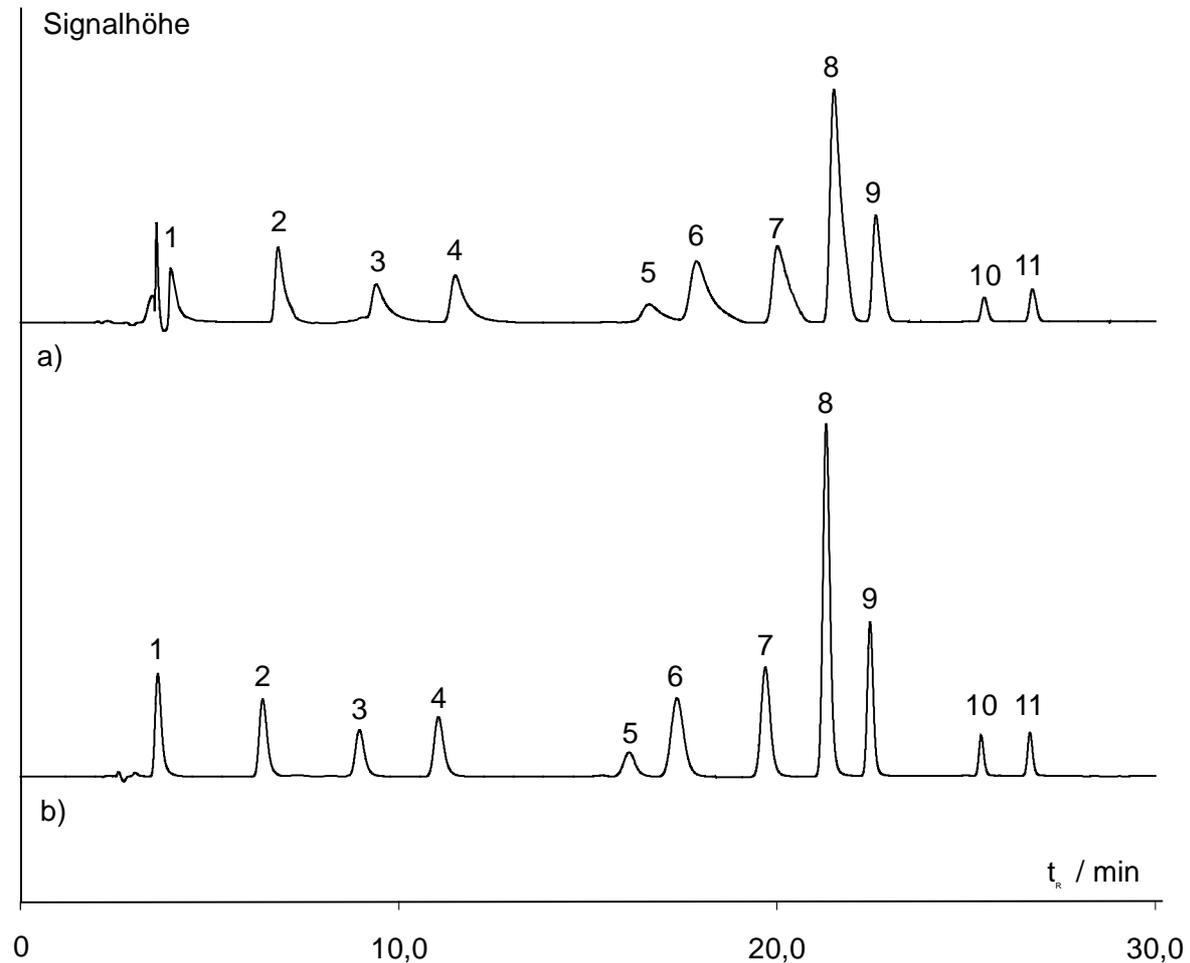


Abb. 4: Chromatogramme zum Vergleich von On-line-SPE und direkter Injektion

a: Anreicherung von 50 mL Wasserprobe; b: direkte Injektion; Peakzuordnung s. Tab. 5

Es ist zu erkennen, daß die Peaks nach On-line-SPE-HPLC breiter waren als die, welche bei direkter Injektion erhalten wurden, und es trat häufig Peak-Tailing auf. Zum Vergleich sind in Tab. 5 die Halbwertsbreiten der einzelnen Peaks gegenübergestellt. Während sich die Halbwertsbreiten der Peaks zu Beginn und am Ende der chromatographischen Trennung nicht sehr stark unterschieden, wiesen die Halbwertsbreiten der mittleren Fraktion größere Unterschiede auf.

Die stark polaren Verbindungen (1 u. 2), die zuerst von der analytischen Säule eluiert wurden, wurden auch dementsprechend zügig von der SPE-Vorsäule gespült. Die Probenaufgabe erfolgte also rascher als bei den später eluierten Substanzen, und das Probenaufgabevolumen war dementsprechend kleiner, was eine schwächer ausgeprägte Peakverbreiterung zur Folge hatte. Bei den zuletzt eluierten Substanzen war das Probenaufgabevolumen zwar größer, die Analyten wurden aber durch den verwendeten Gradienten, d.h. den höheren Anteil an Acetonitril, stärker fokussiert, was ebenfalls schmalere Peaks zur Folge hatte.

Tab. 5: Halbwertsbreiten nach On-line-SPE/HPLC und direkter Injektion

Substanz	Peak-Nr.	HWB / min SPE	HWB / min direkt	Substanz	Peak-Nr.	HWB / min SPE	HWB / min direkt
2,6DAT	1	0,19	0,18	3,5DNA	7	0,40	0,27
2,4DA6NT	2	0,24	0,23	2NphA	8	0,32	0,20
4NA	3	0,34	0,25	2A4,6DNT	9	0,27	0,17
4AT	4	0,38	0,27	3,4DCIA	10	0,18	0,15
4CIA	5	0,45	0,35	4ABPh	11	0,19	0,16
2A4NT	6	0,49	0,36				

HWB: Halbwertsbreite

Das optimierte Gradientenprogramm ist in Tab. 6 aufgeführt. Nachdem das Motorschaltventil auf „inject“ umgeschaltet wurde, wurden die Analyten 2 min lang von der mobilen Phase auf die analytische Säule gespült. Anschließend schaltete das Ventil wieder auf „load“. Zuvor war überprüft worden, ob diese Zeit zur vollständigen Elution der Analyten von der SPE-Vorsäule ausreichte, was der Fall war. Die Umschaltung des Ventils wurde durchgeführt, da so das Spülen der Vorsäule während der Analyse ermöglicht wurde.

Tab. 6: Optimiertes Gradientenprogramm (P2) zur HPLC-Analyse

t / min	ESV in Stellung	Eluentenzusammensetzung		
		P1 (Anreicherung)		
		D / %	E / %	F / %
-25,00	load	72	28	0
00,00	inject	72	28	0
02,00	load	72	28	0
10,00	load	72	28	0
20,00	load	40	60	0
35,00	load	20	80	0

D: Phosphat-Puffer

E: Acetonitril

F: Wasser

Die Absorptionsmaxima der verschiedenen Verbindungen liegen bei unterschiedlichen Wellenlängen. Um die Nachweisempfindlichkeit für die einzelnen Substanzen zu erhöhen, erfolgte die Aufnahme der Chromatogramme bei unterschiedlichen Wellenlängen. Zusätzlich zur in vergangenen Arbeiten (22) gewählten Meßwellenlänge $\lambda = 230$ nm wurde $\lambda = 210$ nm ausgewählt.

Abb. 5 zeigt zwei Chromatogramme nach On-line-SPE-HPLC bei einer Meßwellenlänge von 210 nm und 230 nm im Vergleich. Die Chromatogramme wurden mit Hilfe des optimierten Gradientenprogramms aufgenommen.

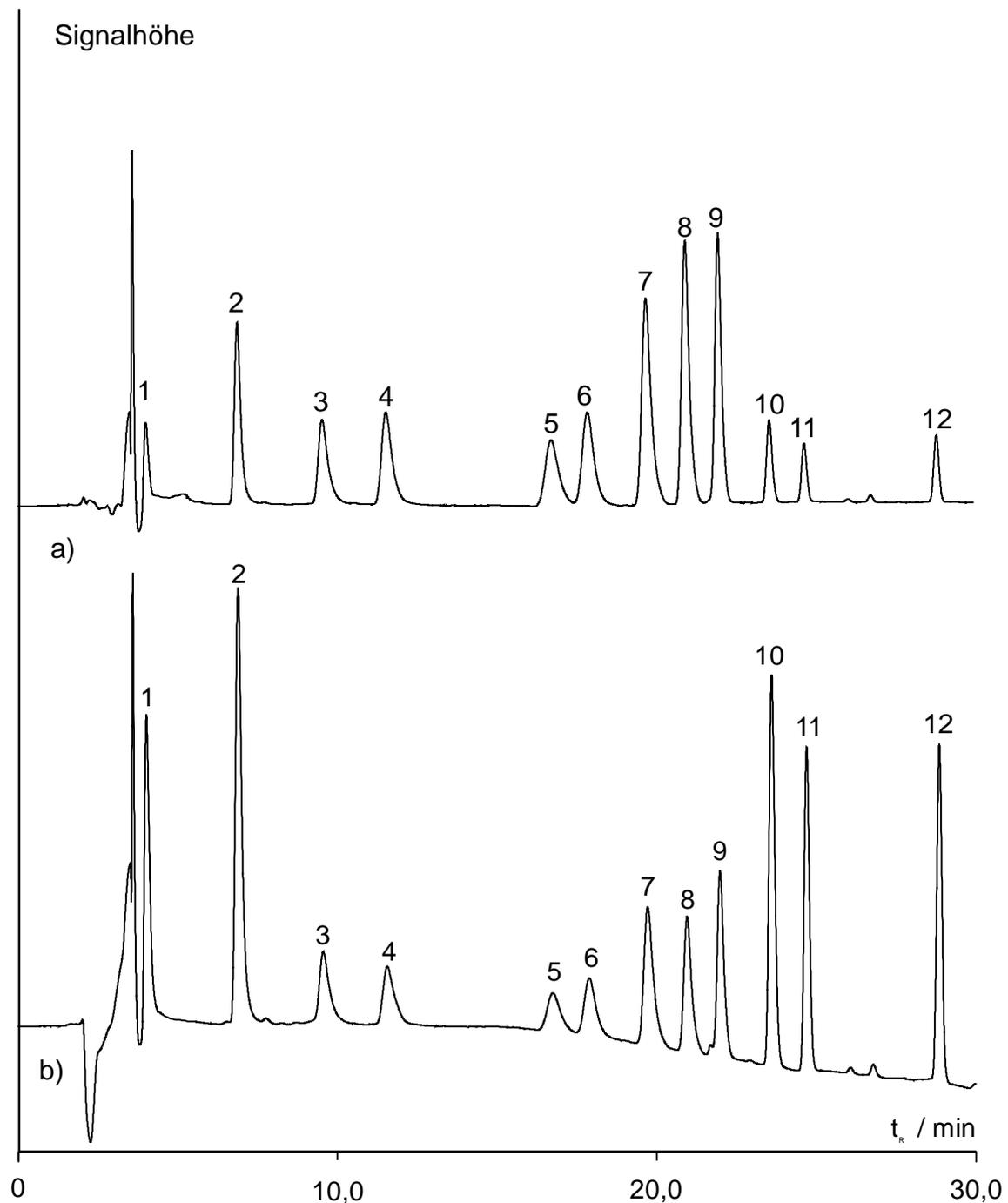


Abb. 5: Chromatogramme des HPLC-SG 1 nach On-line-SPE-HPLC, 210 und 230 nm

a: $\lambda = 230$ nm; b: $\lambda = 210$ nm; Gradient Acetonitril/Phosphatpuffer (pH 7,3; s. Kap. 15.2.4); Peakzuordnung s. Tab. 7

Die Retentionszeiten und die Zuordnung der einzelnen Peaks sind in Tab. 7 angegeben. Außerdem sind die Absorptionsmaxima der einzelnen Verbindungen aufgeführt, die für die Auswahl der geeigneten Meßwellenlängen erforderlich waren. Da die beiden Chromatogramme im selben Maßstab abgebildet sind, läßt sich erkennen, daß sich, je nach gewählter Meßwellenlänge, die Empfindlichkeit des Detektors auf die einzelnen Analyten

teilweise stark unterschied. 3,5-Dinitroanilin, 2-Naphthylamin und 2-Amino-4,6-dinitroanilin wurden bei $\lambda = 230$ nm viel empfindlicher detektiert als bei $\lambda = 210$ nm, da diese Verbindungen dort ein ausgeprägtes UV-Maximum besitzen. Bei 4-Nitroanilin, 4-Aminotoluol und 4-Chloranilin war ebenfalls eine Steigerung der Peakintensitäten bei $\lambda = 230$ nm zu beobachten, die jedoch wesentlich geringer ausfiel, da sich die Intensität der UV-Spektren jener Verbindungen bei $\lambda = 230$ nm nur unwesentlich von denen bei $\lambda = 210$ nm unterscheiden. Bei $\lambda = 210$ nm war für 2,6-Diaminotoluol, 2,4-Diamino-6-nitrotoluol, 3,4-Dichloranilin, 4-Aminobiphenyl und 2,4,5-Trichloranilin im Vergleich zu $\lambda = 230$ nm eine deutliche Steigung der Peakintensitäten zu beobachten, die auf entsprechend große UV-Maxima bei dieser Wellenlänge zurückzuführen ist. Es war deshalb sinnvoll, die Aufzeichnung der Chromatogramme bei diesen beiden Wellenlängen durchzuführen.

Tab. 7: Retentionszeiten und UV-Daten

Substanz	t_R / min	Peak-Nr.	UV-Maxima / nm		
2,6DAT	4,01	1	212	-	287
2,4DA6NT	6,88	2	213	236	346
4NA	9,55	3	201	225	378
4AT	11,55	4	201	234	288
4CIA	16,76	5	201	238	294
2A4NT	17,89	6	-	225/247	292/358
3,5DNA	19,72	7	-	225	260
2NphA	20,96	8	215	236	280
2A4,6DNT	21,99	9	-	226	373
3,4DCIA	23,60	10	207	245	305
4ABPh	24,70	11	201	-	280
2,4,5TCIA	28,86	12	213	245	-

5.3 Optimierung des pH-Werts der Wasserprobe

Die Anreicherung aromatischer Amine erfolgt in der Regel aus Wasserproben, die zuvor stark alkalisch gemacht wurden (pH 12). Werden Realproben mit Natronlauge auf pH 12 gebracht, kommt es oft zur Bildung kolloidaler Niederschläge aus Eisenoxiden und -hydroxiden (41).

Die Lösungen müssen dann zunächst filtriert werden, um ein Verstopfen der Festphase zu verhindern. Da auch die Filter hierbei meist sehr schnell verstopfen, ist dies ein zeitaufwendiger Schritt. Durch eine Einstellung der Probe auf einen niedrigeren pH-Wert kann das Auftreten der Niederschläge verhindert werden. Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluß der pH-Wert der Wasserprobe auf die Extraktion hat.

Dazu wurde zu 1 L bidest. Wasser 1 mL HPLS-SG 1 zugesetzt. Die Konzentration der Analyten in der Wasserprobe betrug somit 1 µg/L. Die Wasserprobe wurde mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt:

- pH 7,0
- pH 8,5
- pH 10,0
- pH 11,0

Die Wasserprobe wurde bei dem jeweils eingestellten pH-Wert je drei mal mit dem oben beschriebenen Verfahren gemessen. Die Wiederfindungsraten wurden bestimmt, indem das Standardgemisch in passender Konzentration direkt in das HPLC System injiziert wurde (20 µL Injektionsvolumen, Dreifachbestimmung). Anschließend wurde der Quotient aus dem Mittelwert der Peakflächen nach On-line-SPE/HPLC und dem Mittelwert der Peakflächen nach Direkteinspritzung gebildet.

In Tab. 8 sind die Wiederfindungsraten der Analyten bei verschiedenen pH-Werten zusammen mit deren pK_{S1} -Werten aufgeführt. Die aufgelisteten pK_S -Werte wurden mit der HAMMET-Gleichung nach (120) berechnet und aus (22) übernommen.

Tab. 8: Abhängigkeit der Wiederfindungsrate vom pH-Wert der Wasserprobe

Substanz	pK _{S1}	Wiederfindungsrate / %			
		pH 7	pH 8,5	pH 10	pH 11
2,6DAT	4,29	7	13	46	52
2,4DA6NT	2,85	95	98	100	101
4NA	0,95	78	78	77	78
4AT	4,98	80	83	100	102
4CIA	3,89	91	91	100	102
2A4NT	2,16	104	103	102	102
3,5DNA	0,32	98	98	98	98
2NphA	4,35	85	84	90	91
2A4,6DNT	0,03	97	98	98	98
3,4DCIA	2,82	95	96	97	98
4ABPh	4,61	69	75	80	89
2,4,5TCIA	0,89	67	69	69	70

Es zeigte sich, daß der pH-Wert der Wasserprobe einen unterschiedlich starken Einfluß auf die Wiederfindung der einzelnen Analyten hatte. Während die Wiederfindungsraten bei 4-Nitroanilin, 2-Amino-4-nitroanilin, 3,5-Dinitroanilin, 2-Amino-4,6-dinitrotoluol und 2,4,5-Trichloranilin nicht von der Erhöhung des pH-Werts beeinflußt wurden, stiegen sie bei 2,4-Diamino-6-nitrotoluol, 4-Chloranilin, 2-Naphthylamin und 3,4-Dichloranilin leicht an. Ein deutlicher Anstieg wurde bei 2,6-Diaminotoluol, 4-Aminotoluol und 4-Aminobiphenyl beobachtet, wobei er bei 2,6-Diaminotoluol am größten war. Betrachtet man die pK_{S1}-Werte dieser Verbindungen, so zeigte sich, daß die Substanzen, deren Wiederfindungsraten am stärksten erhöht wurden, pK_{S1}-Werte ≥ 4 besitzen. Dagegen weisen die Substanzen, deren Wiederfindungsraten nicht von einer Steigerung des pH-Werts beeinflußt wurden, pK_{S1}-Werte $\leq 2,5$ auf. Die Wiederfindungsraten einer Auswahl an Analyten sind in Abb. 6 für die verschiedenen pH-Werte graphisch dargestellt.

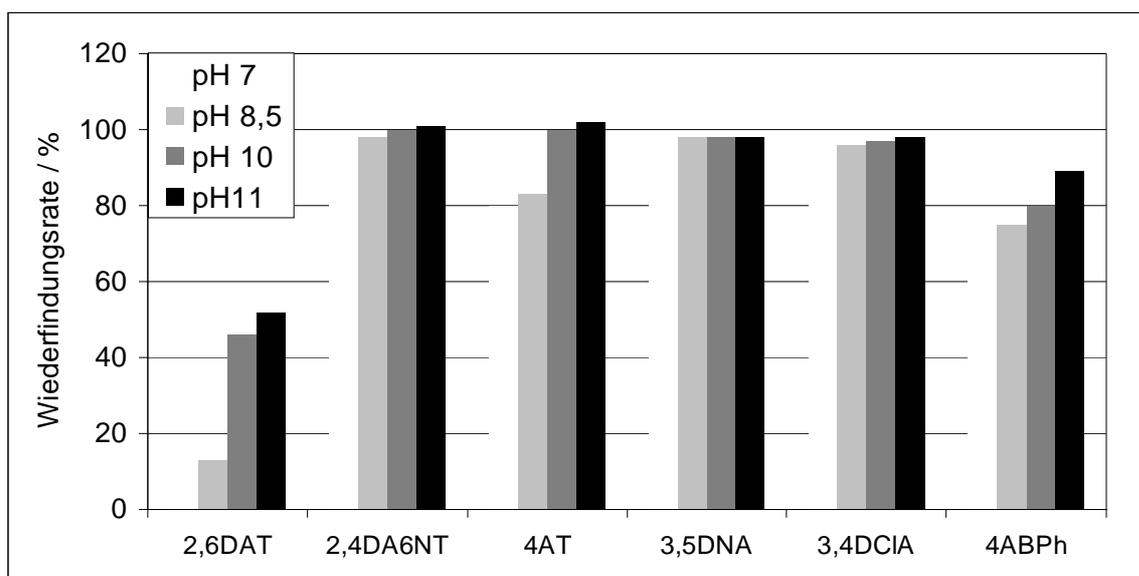


Abb. 6: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten von pH-Wert der Wasserprobe

Für die weiteren Untersuchungen wurde der pH-Wert der Wasserproben auf 10,5 eingestellt.

5.4 Optimierung weiterer Parameter

5.4.1 Fließrate der Wasserprobe

Der Einfluß weiterer Parameter auf die Elution wurde ebenfalls untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob die Änderung der Fließgeschwindigkeit der Wasserprobe durch die SPE-Säule die Wiederfindung der Analyten beeinflusst. Dazu wurden 50 mL einer Wasserprobe (HPLC-SG 1, $c = 1 \mu\text{g/L}$ je Analyt, pH 10,5) je dreimal bei unterschiedlichen Fließraten (1 mL/min, 2,5 mL/min und 5 mL/min) angereichert und die Wiederfindungsraten der Substanzen miteinander verglichen. In Abb. 7 sind die Wiederfindungsraten ausgewählter Verbindungen in Abhängigkeit von der Fließrate aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß die Fließrate im untersuchten Bereich keinen Einfluß auf die Wiederfindungsraten der Verbindungen hat. Auf eine weitere Erhöhung der Fließrate wurde verzichtet, um einen Anstieg des Drucks im Anreicherungssystem zu verhindern. Im weiteren Verlauf erfolgte die Anreicherung deshalb bei einer Fließrate von 5 mL/min.

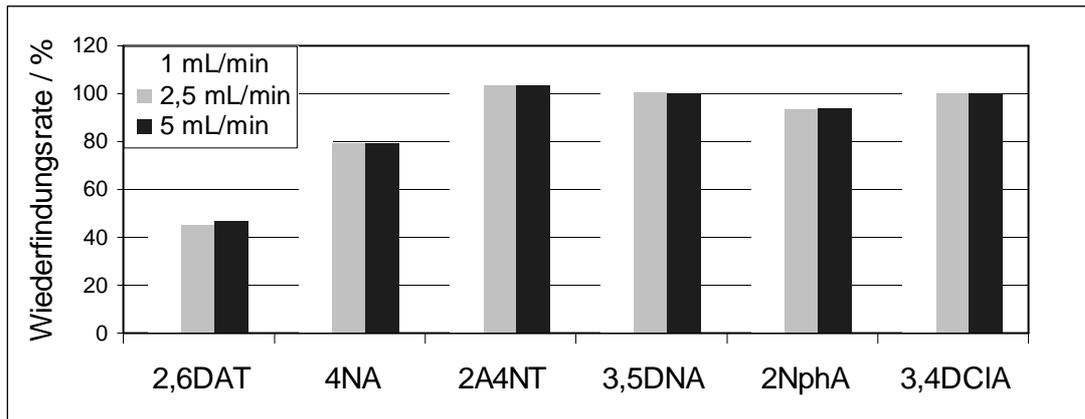


Abb. 7: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten von der Fließrate

5.4.2 Konditionierung

Zur Ermittlung der geeigneten Volumina an organischem Lösungsmittel und Wasser zur Konditionierung der Festphase vor der Anreicherung, wurden die Festphasen mit unterschiedlichen Mengen an Acetonitril und Wasser vorbehandelt. Da jedoch im Anschluß an jede Anreicherung die SPE-Vorsäule mit mindestens 10 mL Acetonitril gespült wurde, erwies sich die für die Konditionierung verwendete Menge an Acetonitril als unerheblich für die Anreicherung. Für die Vorversuche waren bereits jeweils 5 mL Wasser zur Konditionierung verwendet worden. Eine Erhöhung des Volumens (7,5 mL und 10 mL) hatte keinen Einfluß auf die Anreicherung der Analyten. Eine mögliche Verringerung des Wasservolumens wurde nicht untersucht.

In vorhergegangenen Arbeiten (22) wurde anstelle von Wasser Natronlauge ($c = 10^{-5}$ mol/L) zur Konditionierung der Festphase verwendet, da die spätere Anreicherung ebenfalls aus basischer Lösung erfolgte. Eine mögliche Verbesserung der Anreicherung durch den Ersatz des Wassers durch Natronlauge konnte jedoch nicht untersucht werden, da mit der verwendeten Pumpe nur drei unterschiedliche Lösungsmittel gefördert werden konnten und diese Kanäle bereits belegt waren.

5.4.3 Temperatur und Fließrate bei der chromatographischen Trennung

Weil die verwendete HPLC-Apparatur über einen thermostatisierten Säulenofen verfügte, wurden Trennungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, da die Erhöhung der Temperatur oft die Trennleistung der Säule verbessert. Eine zu hohe Temperatur

beeinträchtigte die Trennung der Substanzen, da einige Peaks sich teilweise überlagerten. Die Messungen wurden deshalb bei 30 °C durchgeführt.

Als Fließrate für die Chromatographie wurde 0,5 mL/min gewählt. Bei der verwendeten Säule (Partikelgröße: 5 µm) hätte die Fließrate durchaus erhöht werden können, da der Maximaldruck bei dem verwendeten Gradientenprogramm nur bei 170 bar lag. Dies hätte den Vorteil einer verkürzten Analysenzeit gehabt. Eine Erhöhung der Fließrate hatte jedoch ebenfalls eine verschlechterte Trennung der Substanzen zu Folge und wurde daher nicht durchgeführt.

6 Validierung des Verfahrens

6.1 Wiederfindungsraten und Wiederholgenauigkeit

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgte bei zwei verschiedenen Analytkonzentrationen sowie in zwei unterschiedlichen Matrices.

Zunächst wurden die Wiederfindungsraten für eine Konzentration von 0,5 µg/L je Substanz in bidest. Wasser und in Trinkwasser bestimmt. Die Trinkwasserprobe wurde am 15.11.2000 aus dem Ortsnetz entnommen (Institut für Umwelthygiene, Marburg). Die Wasserprobe aus 250 µL des HPLC-SG 1 in 500 mL bidest. Wasser bzw. 500 mL Trinkwasser wurde mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf pH 10,5 eingestellt. Das Anreichervolumen betrug 50 mL. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Wiederfindungsraten wurden als Quotient aus dem Mittelwert der erhaltenen Peakflächen und der Peakfläche, die bei der direkten Injektion der gleichen Menge an Substanz erhalten wurde, berechnet. Die so erhaltenen Wiederfindungsraten in bidest. Wasser und Trinkwasser und die relativen Standardabweichungen sind in Tab. 9 aufgeführt.

Die Wiederfindungsraten erreichten für die Hälfte der untersuchten Substanzen Werte von über 90 %. Der höchste Wert lag bei 101 % für 2-Amino-4-nitrotoluol und der niedrigste Wert bei 60 % für 2,6-Diaminotoluol. Ein Einfluß der Matrix konnte nicht festgestellt werden. Die Wiederfindungsraten in Trinkwasser und in bidest. Wasser unterschieden sich nur minimal.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei der Bestimmung in bidest. Wasser zwischen 0,26 % für 3,4-Dichloranilin und 5,2 % für 4-Nitroanilin. Für den Großteil der Verbindungen lagen die Werte bei weniger als 2,5 %. In Trinkwasser wurden relative Standardabweichungen zwischen 0,29 % für 3,4-Dichloranilin und 5,03 % für 4-Nitroanilin ermittelt. Auch hier lag der Großteil der Werte bei unter 2,5 %. Beim Vergleich der relativen Standardabweichungen in den verschiedenen Matrices ließ sich kein Trend erkennen. Ein Teil der Verbindungen wies in Trinkwasser ein anderer Teil in bidest. Wasser eine höhere Wiederholgenauigkeit auf.

Tab. 9: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser und Trinkwasser (c = 0,5 µg/L)

Substanz	λ / nm	WDF in BW	S _{rel.}	WDF in TW	S _{rel.}
		/ %	/ %	/ %	/ %
2,6DAT	210	60	1,65	64	1,76
2,4DA6NT	210	99	2,02	101	2,81
4NA	230	93	5,20	94	5,03
4AT	230	99	4,08	98	3,50
4CIA	230	100	2,19	97	1,25
2A4NT	230	101	1,63	101	3,76
3,5DNA	230	93	0,84	94	0,41
2NphA	230	84	5,17	90	1,74
2A4,6DNT	230	87	0,31	87	0,66
3,4DCIA	210	87	0,26	88	0,29
4ABPh	210	75	0,96	75	0,89
2,4,5TCIA	210	68	0,68	69	1,11

S_{rel.}: relative Standardabweichung

WDF: Wiederfindungsrate

TW: Trinkwasser

BW: bidest. Wasser

λ : Meßwellenlänge

Auf die gleiche Weise wurden die Wiederfindungsraten für eine Analytkonzentration von 5,0 µg/L bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser und Trinkwasser (c = 5,0 µg/L)

Substanz	λ / nm	WDF in BW	S _{rel.}	WDF in TW	S _{rel.}
		/ %	/ %	/ %	/ %
2,6DAT	210	66	1,85	73	1,98
2,4DA6NT	210	98	2,39	97	3,54
4NA	230	95	4,96	95	5,24
4AT	230	102	3,26	98	1,34
4CIA	230	100	1,89	100	1,90
2A4NT	230	103	3,12	101	4,29
3,5DNA	230	94	1,32	90	5,42
2NphA	230	93	4,59	91	4,21
2A4,6DNT	230	90	0,43	85	2,86
3,4DCIA	210	89	0,31	87	2,66
4ABPh	210	75	1,13	69	2,00
2,4,5TCIA	210	71	0,52	66	1,73

S_{rel.}: relative Standardabweichung

WDF: Wiederfindungsrate

TW: Trinkwasser

BW: bidest. Wasser

λ : Meßwellenlänge

Die Wiederfindungsraten erreichten für die Hälfte der untersuchten Substanzen in beiden Matrices Werte von über 90 %. Der höchste Wert lag bei 103 % für 2-Amino-4-nitrotoluol in bidest. Wasser und der niedrigste Wert bei 66 % für 2,6-Diaminotoluol in Trinkwasser. Ein Einfluß der Matrix konnte nicht festgestellt werden. Die Wiederfindungsraten in Trinkwasser und in bidest. Wasser unterschieden sich nur geringfügig, lagen jedoch im Durchschnitt für bidest. Wasser etwas höher.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei der Bestimmung in bidest. Wasser zwischen 0,31 % für 3,4-Dichloranilin und 4,96 % für 4-Nitroanilin. Für den Großteil der Verbindungen lagen die Werte bei weniger als 2,5 %. In Trinkwasser wurden relative Standardabweichungen zwischen 1,34 % für 4-Aminotoluol und 5,42 % für 3,5-Dinitroanilin festgestellt. Der Großteil der Werte lag unter 3,0 %. Beim Vergleich der relativen

Standardabweichungen in den verschiedenen Matrices zeigte sich, daß der Großteil der Verbindungen in Trinkwasser eine höhere relative Standardabweichung aufwies.

6.2 Bestimmung der Durchbruchsvolumina

Eine wichtiger Parameter bei der Beurteilung von Festphasen ist das Durchbruchsvolumen der Analyten. Das Durchbruchsvolumen stellt das maximale Probenvolumen dar, das mit einer theoretischen Wiederfindungsrate von 100 % aufgegeben werden kann. Wird dieses Volumen überschritten, so bricht der Analyt am Säulenende durch und es kommt zu Analytverlusten, die eine Verfälschung der Analyse bewirken. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Durchbruchsvolumen abzuschätzen.

Eine Möglichkeit ist es, eine Wasserprobe, die den Analyten enthält, über die Festphase zu leiten und das UV-Signal direkt nach dem Durchlaufen der Festphase aufzuzeichnen. Die Analytkonzentration sollte dabei im Spurenbereich liegen, um die Kapazität des Sorbens nicht zu überschreiten. Bei Auftragung des Signals gegen das durchlaufene Volumen wird eine Durchbruchskurve erhalten, die unter idealen Bedingungen eine bilogarithmische Form aufweist. Das Durchbruchsvolumen V_B ist als das Volumen definiert, bei dem das Signal 1 % des maximalen Signals erreicht.

Die zweite Möglichkeit zur Abschätzung des Durchbruchsvolumens besteht darin, die Festphasenextraktion mehrmals mit steigenden Anreicherungs volumina durchzuführen. Die angereicherte Stoffmenge wird dabei konstant gehalten. Anschließend werden die Wiederfindungsraten gegen das Anreicherungs volumen aufgetragen. Das Anreicherungs volumen, bei dem die Wiederfindungsraten zu sinken beginnen, die Linearität der Funktion also endet, wird als Durchbruchsvolumen angenommen. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß auf diese Weise die Durchbruchsvolumina mehrerer Verbindungen gleichzeitig und bei realen experimentellen Bedingungen bestimmt werden können.

Zur Bestimmung der Durchbruchvolumina der hier untersuchten Substanzen wurde die zweite Möglichkeit angewandt. Die Wasserproben wurden aus HPLC-SG 1 in bidest. Wasser hergestellt und mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf pH 10 eingestellt. Die untersuchten Anreicherungs volumina sowie die Analyt-Konzentrationen der jeweiligen Wasserprobe sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Untersuchte Anreicherungs volumina und Konzentrationen der Wasserproben

Anreicherungs- volumen / mL	Konzentration der Wasserprobe / ($\mu\text{g/L}$)	Anreicherungs- volumen / mL	Konzentration der Wasserprobe / ($\mu\text{g/L}$)
25	2,00	200	0,25
50	1,00	300	0,17
100	0,50	500	0,10
150	0,33	600	0,08

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch Vergleich mit den bei der direkten Injektion einer adäquaten Menge an Analyt erhaltenen Meßwerte wurden die Wiederfindungsraten berechnet. In Abb. 8 sind die so erhaltenen Wiederfindungsraten einer Auswahl von Verbindungen in Abhängigkeit vom Anreicherungs volumen aufgetragen.

Bis zu einem Anreicherungs volumen von ca. 300 mL war der Verlauf der Wiederfindungsraten nahezu konstant. Eine weitere Erhöhung des Anreicherungs volumens führte zu einem leichten Absinken der Wiederfindungsraten. Ein deutlicher Verlust an Analyten war allerdings auch bei einem Anreicherungs volumen von 600 mL außer für 4-Chloranilin nicht festzustellen. In Tab. 12 sind die abgeschätzten Durchbruchvolumina aller Verbindungen aufgeführt.

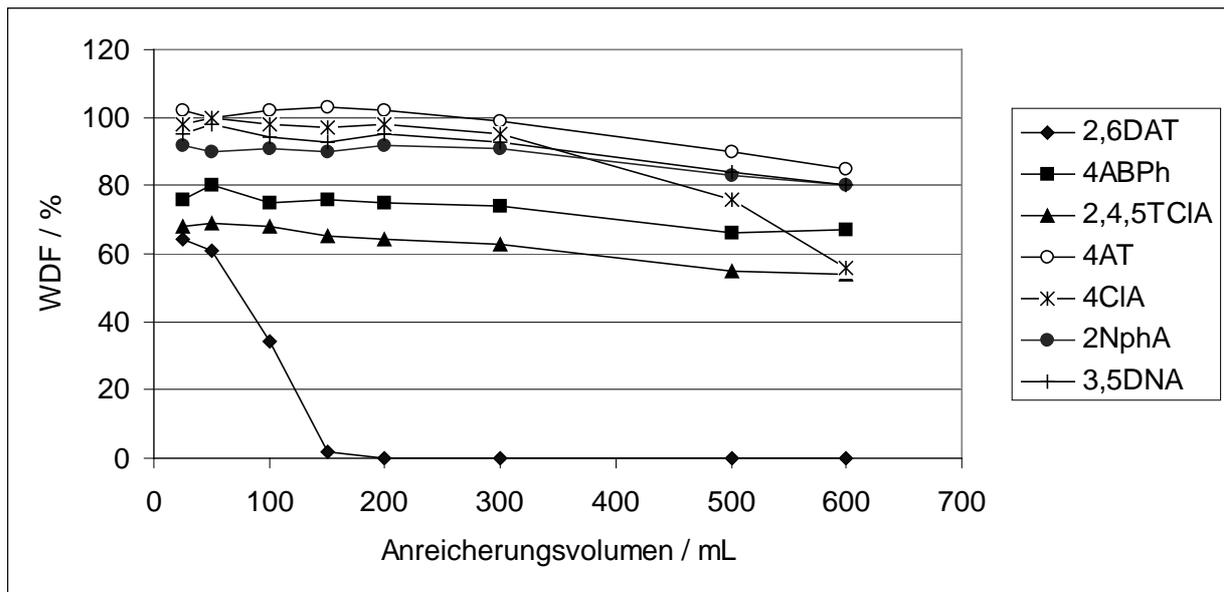


Abb. 8: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten vom Anreicherungs volumen bei Online-SPE

Tab. 12: Durchbruchsvolumina bei On-line-SPE mit HR-P-Vorsäulen

Substanz	Durchbruchsvolumen / mL	Substanz	Durchbruchsvolumen / mL
2,6DAT	≤ 25	3,5DNA	≥ 300
2,4DA6NT	≥ 300	2NphA	≥ 300
4NA	≥ 300	2A4,6DNT	≥ 300
4AT	≥ 300	3,4DCIA	≥ 300
4CIA	≥ 300	4ABPh	≥ 300
2A4NT	≥ 300	2,4,5TCIA	≥ 300

Die Werte lagen für alle Verbindungen, außer für 2,6-Diaminotoluol mit einem Durchbruchsvolumen von ca. 25 mL, bei über 300 mL. Auf eine weitere Erhöhung des Anreicherungs volumens wurde verzichtet, da die Anreicherungszeit sonst unverhältnismäßig hoch gewesen wäre. Außerdem trat bei der Erhöhung des Anreicherungs volumens zunehmend eine Peakverbereitung mit Peaktailing auf. In Abb. 8 sind zwei Chromatogramme im selben Maßstab vergleichend dargestellt. Chromatogramm b wurde nach Anreicherung von 50 mL

Wasserprobe erhalten, Chromatogramm a nach Anreicherung von 300 mL. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 13 aufgeführt. Der Unterschied der Peakformen ist deutlich zu erkennen.

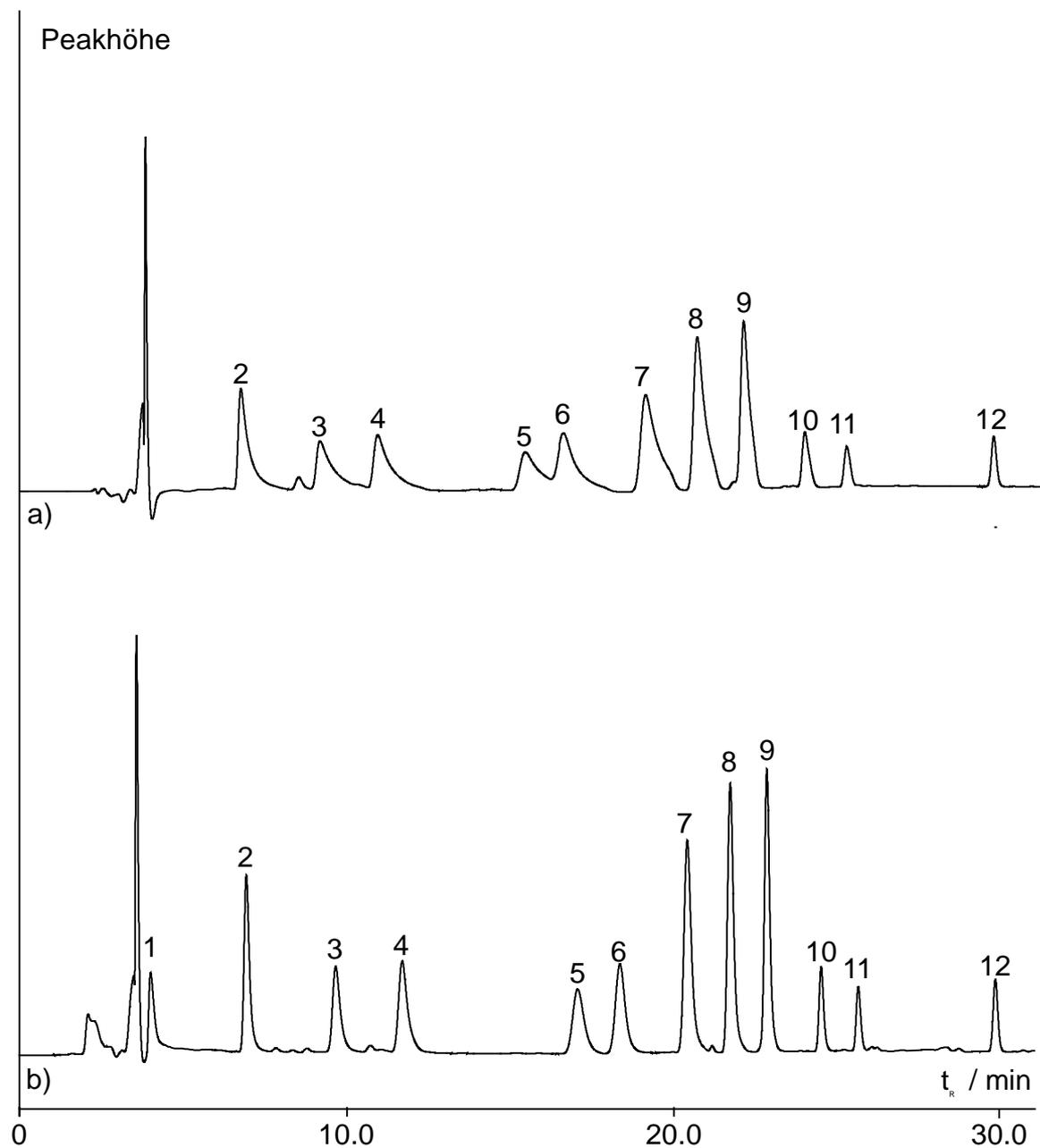


Abb. 9: Chromatogrammvergleich bei unterschiedlichen Anreicherungs volumina,

HR-P-Vorsäule

a: Anreicherungs volumen 300 mL; b: Anreicherungs volumen 50 mL, $\lambda = 230\text{nm}$,
Peakzuordnung s. Tab. 13

Diese ist dadurch zu erklären, daß sich die Probenaufgabe auf die analytische Säule bei dem hier verwendeten Rückspül-Modus mit steigenden Anreicherungs volumina verlängerte, da die

Analyten weiter in die SPE-Vorsäule gewandert waren. Demgegenüber sind die Analyten bei geringem Anreicherungsvolumen an Anfang der Säule fokussiert und werden rasch eluiert. Ein zu hohes Anreicherungsvolumen war also auch aus chromatographischen Gründen nicht sinnvoll.

Tab. 13: Zuordnung der Peaknummern nach On-line-SPE/HPLC mit HR-P-Festphasen

Substanz	Peak-Nr.	Substanz	Peak-Nr.
2,6DAT	1	3,5DNA	7
2,4DA6NT	2	2NphA	8
4NA	3	2A4,6DNT	9
4AT	4	3,4DCIA	10
4CIA	5	4ABPh	11
2A4NT	6	2,4,5TCIA	12

6.3 Kalibrierung zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Die Kalibrierung des Verfahrens erfolgte für ein Anreicherungsvolumen von 50 mL. Dieses vergleichsweise geringe Volumen wurde gewählt, da Vorversuche gezeigt hatten, daß hierbei bereits Bestimmungsgrenzen $\leq 0,1 \mu\text{g/L}$ zu erwarten waren und die Analysenzeit so möglichst klein gehalten werden konnte.

Unter Verwendung von HPLC-SG 1 wurden Wasserproben unterschiedlicher Konzentration in bidest. Wasser hergestellt. Sie enthielten

- 0,1 $\mu\text{g/L}$
- 0,5 $\mu\text{g/L}$
- 1,0 $\mu\text{g/L}$
- 1,5 $\mu\text{g/L}$
- 2,0 $\mu\text{g/L}$

je Analyt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß 10 Datenpaare für die Berechnung der Kenndaten zur Verfügung standen.

Die Kenndaten der Kalibrierung und die Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 38402-51 ermittelt. Hierbei ist die Bestimmungsgrenze X_B abhängig von der Verfahrensstandardabweichung s_x :

$$X_B = \sqrt{2} \cdot t(P = 95 \%, f_0) \cdot s_x$$

X_B : Bestimmungsgrenze

t: Student-Faktor

P: statistische Sicherheit

f_0 : Freiheitsgrad der Verfahrensstandardabweichung

s_x : Verfahrensstandardabweichung

Die berechneten Kenndaten der Kalibrierung, die verwendeten Meßwellenlängen sowie die Bestimmungsgrenzen sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Kenndaten der Kalibrierung zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Substanz	λ / nm	Ordinaten- abschnitt / mAU	Steigung / (mAU/ ($\mu\text{g/L}$)]	s_x /($\mu\text{g/L}$)	V_k / %	X_B / ($\mu\text{g/L}$)
2,6DAT	210	-0,231	19,340	0,025	2,45	0,082
2,4DA6NT	210	-0,541	18,020	0,194	1,90	0,063
4NA	230	0,160	4,514	0,019	1,89	0,063
4AT	230	-0,120	5,847	0,021	2,06	0,069
4CIA	230	-0,057	4,649	0,011	1,08	0,036
2A4NT	230	-0,161	6,551	0,010	1,00	0,033
3,5DNA	230	0,059	10,236	0,011	1,07	0,035
2NphA	230	-0,042	11,611	0,012	1,24	0,041
2A4,6DNT	230	0,136	8,966	0,012	1,19	0,040
3,4DCIA	210	0,100	11,758	0,012	1,22	0,041
4ABPh	210	0,021	7,733	0,014	1,41	0,047
2,4,5TCIA	210	0,295	7,228	0,023	2,26	0,075

 λ : Meßwellenlänge s_x : Verfahrensstandardabweichung V_k : Variationskoeffizient X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 1,0 % für 2-Amino-4-nitrotoluol und 2,45 % für 2,6-Diaminotoluol. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 2 %. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 33 ng/L für 2-Amino-4-nitrotoluol und 82 ng/L für 2,6-Diaminotoluol. Bei einem Großteil der Verbindungen lag X_B unter 50 ng/L. Dies zeigt, daß bereits bei einem Anreicherungsvolumen von 50 mL die Bestimmungsgrenzen den Anforderungen genügen, um Analysen im Grenzwertbereich durchzuführen.

In Abb. 10 ist beispielhaft die Kalibriergerade von 3,5-Dinitroanilin dargestellt. Diese war mit einem Variationskoeffizienten von 1,07 %, wie auch die Kalibriergeraden der übrigen Verbindungen, linear im Sinne der verwendeten DIN. Die Güte der Kalibrierung wird auch

dadurch deutlich, daß die Datenpunkte bei gleicher Konzentration so dicht zusammen lagen, daß die Abbildung des Vertrauensbereichs nicht möglich war, weil dies optisch lediglich eine Verbreiterung der Geraden zur Folge gehabt hätte.

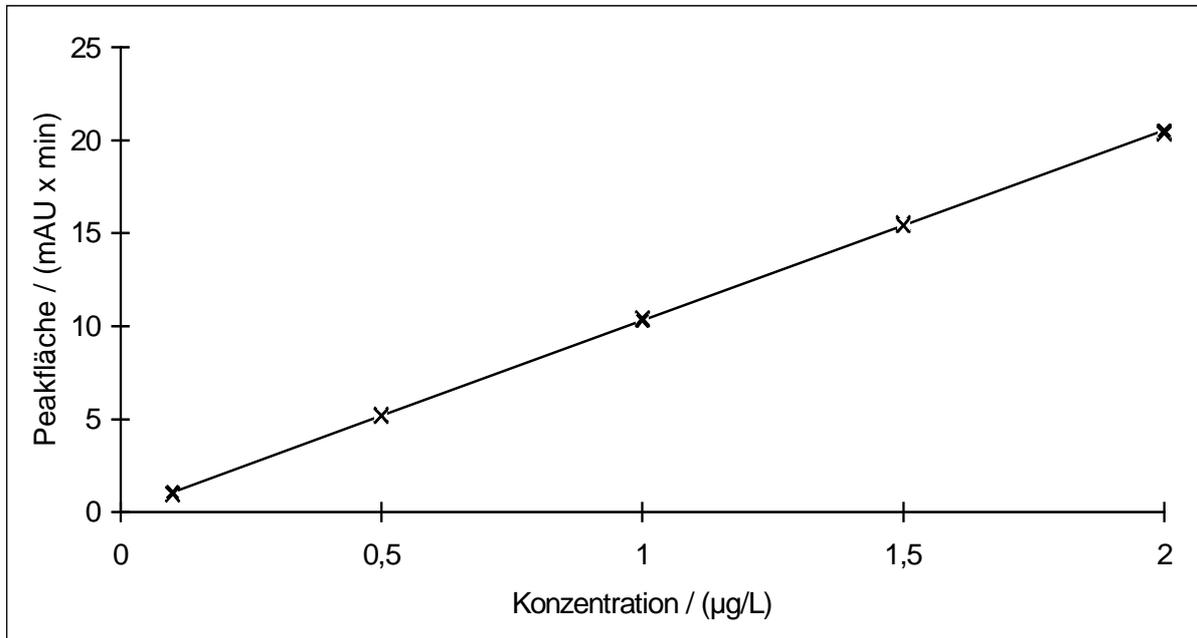


Abb. 10: Kalibriergrade für 3,5DNA nach Anreicherung von 50 mL Wasserprobe

6.4 Arbeitsbereich

Um den linearen Arbeitsbereich festzulegen, wurde die Kalibrierung des Verfahrens auf höhere Analytkonzentrationen ausgeweitet.

Unter Verwendung von HPLC-SG 1 wurden Wasserproben unterschiedlicher Konzentration in bidest. Wasser hergestellt. Sie enthielten

- 1,0 $\mu\text{g/L}$
- 10,0 $\mu\text{g/L}$
- 20,0 $\mu\text{g/L}$
- 30,0 $\mu\text{g/L}$
- 40,0 $\mu\text{g/L}$

je Analyt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß 10 Datenpaare für die Berechnung der Kenndaten zur Verfügung standen.

In Abb. 11 ist beispielhaft die Kalibriergerade von 2,4-Diamino-6-nitrotoluol dargestellt. Diese war mit einem Variationskoeffizienten von 1,30 %, wie auch die Kalibriergeraden der übrigen Verbindungen, linear im Sinne der verwendeten DIN. Auch hier waren die jeweiligen zwei Datenpunkte bei gleicher Konzentration kaum zu unterscheiden.

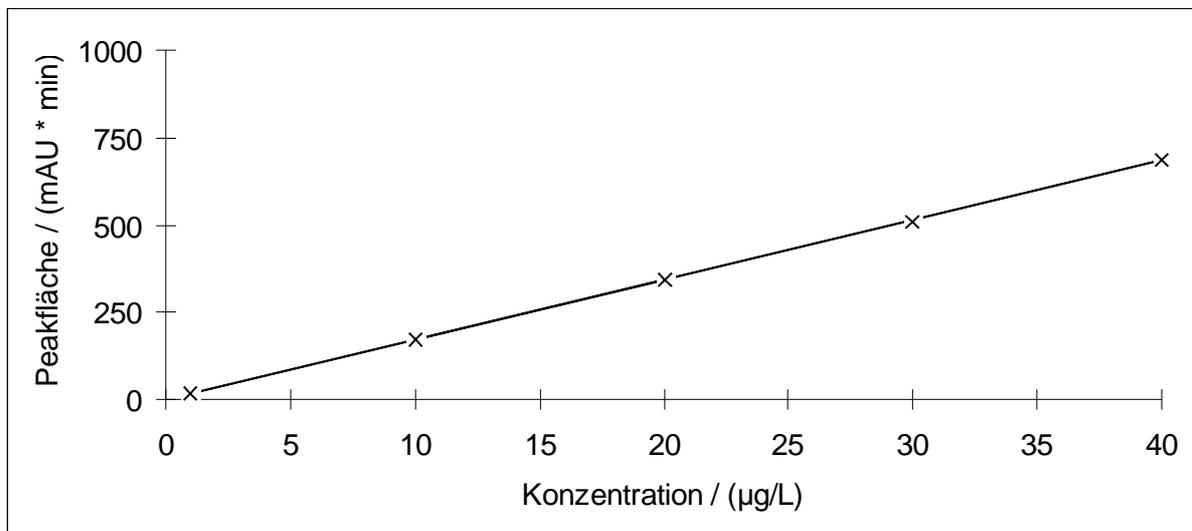


Abb. 11: Kalibriergerade für 2,4DA6NT zur Bestimmung des linearen Arbeitsbereichs

Die Kenndaten der Kalibrierung und die Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 38402-51 ermittelt und sind in Tab. 15 aufgeführt.

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 0,64 % für 2-Amino-4-nitrotoluol und 2,91 % für 2,6-Diaminotoluol. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 2 %. Die Ausweitung des Konzentrationsbereichs hatte keinen Einfluß auf die Linearität der Kalibriergerade. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 0,26 µg/L für 2-Amino-4-nitrotoluol und 0,95 µg/L für 4-Chloranilin. Die Erhöhung der Bestimmungsgrenzen nach Erhöhung der Analytkonzentration in den Kalibrierproben war bei dem angewendeten DIN-Verfahren zu erwarten. In dem untersuchten Konzentrationsbereich wurde für alle Analyten, außer für 2,6-Diaminotoluol, eine lineare Konzentrationsabhängigkeit des Meßsignals festgestellt. Für 2,6-Diaminotoluol reichte der lineare Arbeitsbereich nur bis zu einer Konzentration von 20 µg/L.

Tab. 15: Kenndaten der Kalibrierung zur Ermittlung des linearen Arbeitsbereichs

Substanz	λ / nm	Ordinaten- abschnitt / mAU	Steigung / (mAU/ [$\mu\text{g/L}$])	s_x / ($\mu\text{g/L}$)	V_k / %	X_B / ($\mu\text{g/L}$)
2,6DAT	210	2,162	22,640	0,226	2,91	0,78
2,4DA6NT	210	-1,110	17,170	0,115	0,76	0,37
4NA	230	-0,028	4,834	0,282	2,22	0,92
4AT	230	-1,784	7,268	0,113	0,94	0,40
4CIA	230	0,413	4,948	0,294	2,24	0,95
2A4NT	230	-0,120	6,597	0,081	0,64	0,26
3,5DANN	230	0,390	9,942	0,164	1,30	0,54
2NphA	230	0,737	11,498	0,193	1,52	0,63
2A4,6DNT	230	0,668	8,691	0,121	0,95	0,40
3,4DCIA	210	1,265	11,930	0,179	1,76	0,59
4ABPh	210	1,330	8,176	0,250	1,97	0,82
2,4,5TCIA	210	1,720	7,938	0,258	2,04	0,84

 λ : Messwellenlänge s_x : Verfahrensstandardabweichung V_k : Variationskoeffizient X_B : Bestimmungsgrenze

7 Vergleich mit anderen Verfahren

7.1 Off-line SPE

7.1.1 Allgemeine Vorgehensweise

Um die hier untersuchte On-line-SPE mit dem Off-line-Modus zu vergleichen, wurden Anreicherungsversuche mit Chromabond HR-P-Kartuschen durchgeführt. Es handelte sich hierbei um 3 mL-Polypropylenkartuschen, die 200 mg des HR-P-Materials enthielten.

Die Festphasen wurden mit jeweils 3 x 1 mL Acetonitril und 3 x 1 mL bidest. Wasser jeweils 5 min konditioniert. Die Wasserproben wurden mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf pH 10 eingestellt und mit ca. 10 mL/min mittels einer Schlauchpumpe über die Festphase geleitet. Anschließend wurden die Festphasen mit 2 mL bidest. Wasser gewaschen und mindestens 5 min im Membranpumpenvakuum getrocknet. Die Elution der Analyten von der Säule erfolgte mit 3 mL Acetonitril. 500 μL des Eluats wurden mit 500 μL bidest. Wasser gemischt und in das HPLC-System injiziert (je 20 μL).

7.1.2 Durchbruchsvolumina

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Durchbruchsvolumina. Dafür wurde die SPE mit unterschiedlichen Anreicherungsolumina durchgeführt. Die Absolutmenge an angereicherten Analyten wurde dabei konstant gehalten. Es wurden

- 100 mL
- 250 mL
- 500 mL
- 750 mL
- 1000 mL

Wasserprobe auf die oben beschriebene Art und Weise (s. Kap. 7.1.1) angereichert. Die Analytkonzentrationen variierten dabei zwischen 10 $\mu\text{g/L}$ (1000 mL) und 100 $\mu\text{g/L}$ (100 mL).

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Um die Wiederfindungsraten zu ermitteln, wurden die Analyten in entsprechender Konzentration direkt injiziert und die Ergebnisse mit den Werten verglichen, die nach SPE erhalten wurden.

In Abb. 12 ist der Verlauf der Wiederfindungsraten mit steigendem Anreicherungsvolumen für einige ausgewählte Verbindungen dargestellt.

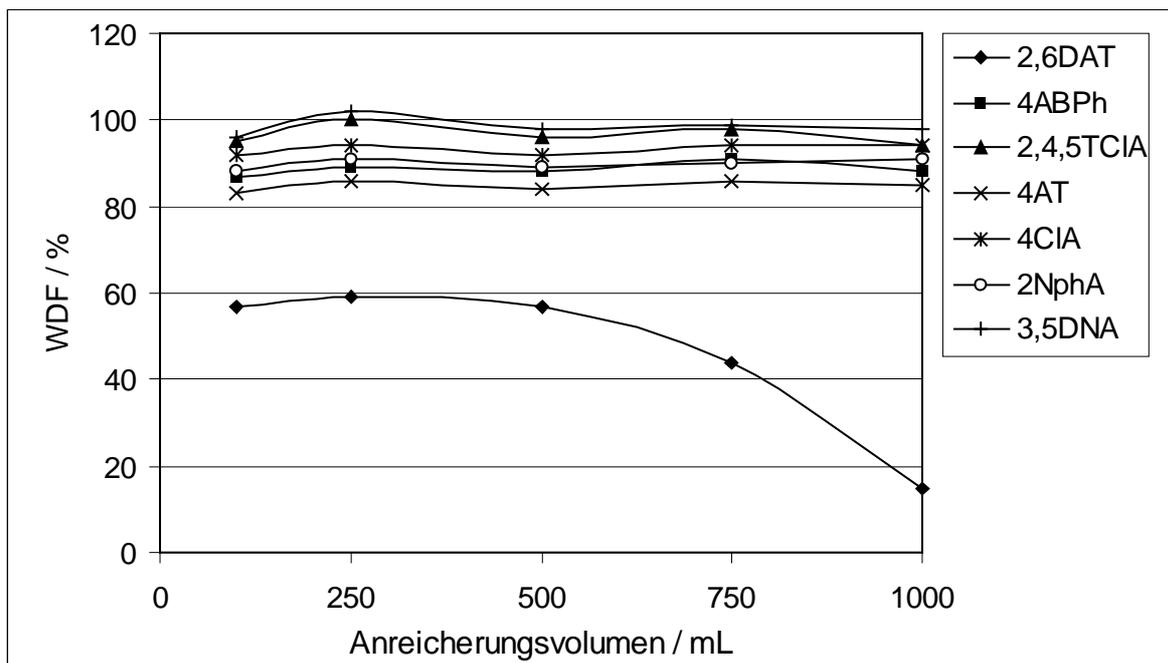


Abb. 12: Abhängigkeit der Wiederfindungsraten vom Anreicherungsvolumen bei Off-line-SPE

Für die untersuchten Verbindungen wurde, außer bei 2,6-Diaminotoluol, auch bei einem Anreicherungsvolumen von 1000 mL noch ein linearer Verlauf festgestellt. Somit lagen die Durchbruchsvolumina für diese Verbindungen bei über 1000 mL. Bei 2,6-Diaminotoluol endet der lineare Verlauf bei ca. 500 mL, weshalb dieser Wert als Durchbruchsvolumen angenommen wurde.

In Tab. 16 sind die geschätzten Durchbruchsvolumina aller untersuchten Verbindungen und die Wiederfindungsraten nach Anreicherung von 500 mL ($c = 20 \mu\text{g/L}$) aufgeführt.

Tab. 16: Wiederfindungsraten und Durchbruchvolumina nach Off-line-SPE

Substanz	WDF / % (500 mL)	S _{rel.} / %	Durchbruchvolumen / mL
2,6DAT	57	4,56	≥ 500
2,4DA6NT	94	5,76	≥ 1000
4NA	99	7,54	≥ 1000
4AT	84	6,74	≥ 1000
4CIA	92	5,67	≥ 1000
2A4NT	99	5,63	≥ 1000
3,5DNA	98	4,91	≥ 1000
2NphA	89	7,64	≥ 1000
2A4,6DNT	102	5,27	≥ 1000
3,4DCIA	99	5,49	≥ 1000
4ABPh	88	4,99	≥ 1000
2,4,5TCIA	96	5,97	≥ 1000

WDF: Wiederfindungsrate S_{rel.}: rel. Standardabweichung

7.1.3 Kalibrierung

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Analytkonzentrationen lagen bei

- 5 µg/L
- 10 µg/L
- 15 µg/L
- 20 µg/L
- 25 µg/L

Es wurden jeweils 250 mL angereichert und dabei Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß jeweils 10 Datenpaare zur Auswertung zur Verfügung standen. Die Kenndaten der

Kalibrierung und die Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 38402-51 ermittelt und sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 17: Kenndaten der Kalibrierung und Bestimmungsgrenzen

Substanz	λ / nm	Ordinaten- abschnitt / mAU	Steigung / (mAU/ [$\mu\text{g/L}$])	s_x / ($\mu\text{g/L}$)	V_k / %	X_B / ($\mu\text{g/L}$)
2,6DAT	210	-0,262	0,510	1,233	8,22	4,02
2,4DA6NT	210	-0,280	0,534	1,086	7,24	3,54
4NA	230	-0,107	0,166	1,147	7,65	3,74
4AT	230	-0,168	0,198	0,930	6,20	3,04
4CIA	230	-0,090	0,164	1,200	8,00	3,91
2A4NT	230	-0,043	0,227	1,196	7,97	3,90
3,5DNA	230	-0,047	0,391	1,116	7,44	3,63
2NphA	230	-1,780	0,394	1,325	8,84	4,32
2A4,6DNT	230	0,002	0,367	1,205	8,04	3,93
3,4DCIA	210	-0,021	0,492	1,283	8,55	4,18
4ABPh	210	-0,165	0,405	1,222	8,15	3,99
2,4,5TCIA	210	0,126	0,519	1,150	7,67	3,75

λ : Messwellenlänge

s_x : Verfahrensstandardabweichung

V_k : Variationskoeffizient

X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 6,20 % für 4-Aminotoluol und 8,84 % für 2-Naphthylamin. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 3,04 $\mu\text{g/L}$ für 4-Aminotoluol und 4,32 $\mu\text{g/L}$ für 2-Naphthylamin.

In Abb. 13 ist beispielhaft die Kalibriergerade für 3,5-Dinitroanilin mit oberem und unterem Vertrauensbereich dargestellt. Diese Kalibriergerade mit einem Variationskoeffizienten von

7,44 % war wie auch die Kalibriergeraden der übrigen Verbindungen linear im Sinne der verwendeten DIN.

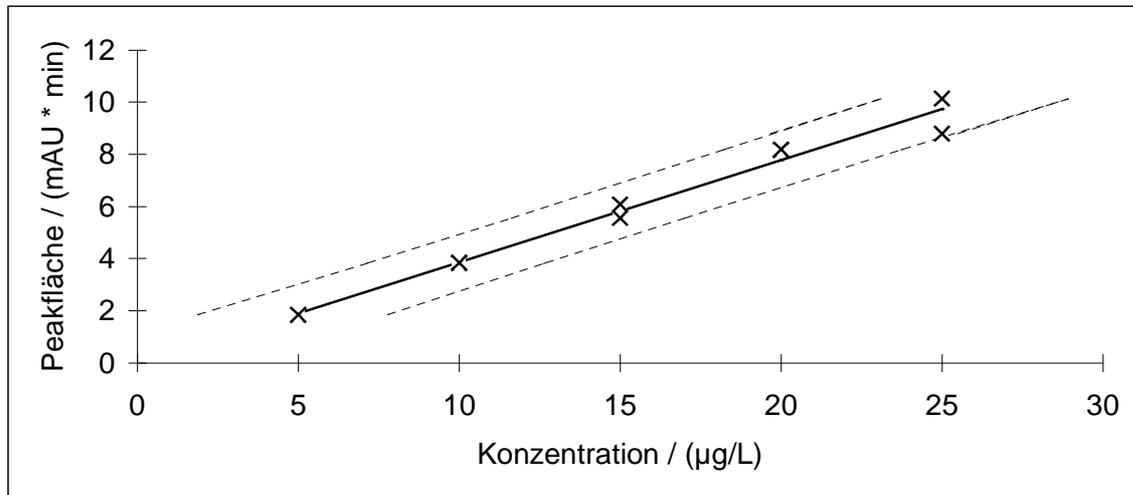


Abb. 13: Kalibriergerade für 3,5DNA nach Off-line-SPE

7.2 On-line SPE mit PRP-1-Vorsäulen

Um das verwendete HR-P-Material (Oberfläche: $1200 \text{ m}^2/\text{g}$) mit einem weniger stark vernetzten polymeren Sorbens zu vergleichen, wurden On-line-SPE-Versuche mit PRP-1-Vorsäulen durchgeführt (114). Es handelt sich bei diesem Material ebenfalls um ein PS-DVB-Kopolymer mit einer kleineren spezifischen Oberfläche (Oberfläche: $415 \text{ m}^2/\text{g}$).

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgte bei zwei verschiedenen Analytkonzentrationen sowie in zwei unterschiedlichen Matrices. Zunächst wurden die Wiederfindungsraten für eine Konzentration von $0,5 \text{ µg/L}$ je Substanz in bidest. Wasser und in Trinkwasser bestimmt. Das Trinkwasser wurde am 13.02.2001 aus dem Ortsnetz entnommen (Institut für Umwelthygiene, Marburg). Die Wasserproben aus 250 µL des HPLC-SG 1 in 500 mL bidest. Wasser bzw. 500 mL Trinkwasser wurden mit Natronlauge ($c = 10 \text{ mol/L}$) auf pH 10 eingestellt. Das Anreichervolumen betrug 50 mL . Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die so erhaltenen Wiederfindungsraten in bidest. Wasser und Trinkwasser und die relativen Standardabweichungen sind in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser und Trinkwasser ($c = 0,5 \mu\text{g/L}$), PRP-1-Vorsäule

Substanz	λ / nm	WDF in BW	$S_{\text{rel.}}$	WDF in TW	$S_{\text{rel.}}$
		/ %	/ %	/ %	/ %
2,6DAT	210	32	8,79	29	10,09
2,4DA6NT	210	84	1,98	85	2,48
4NA	230	98	8,63	97	12,71
4AT	230	98	5,69	101	7,21
4CIA	230	96	2,36	94	1,42
2A4NT	230	97	1,29	100	1,62
3,5DNA	230	92	1,52	95	0,94
2NphA	230	84	1,96	83	2,40
2A4,6DNT	230	85	1,36	87	0,96
3,4DCIA	210	89	2,36	88	1,12
4ABPh	210	86	2,98	89	2,31
2,4,5TCIA	210	66	5,36	64	7,41

WDF: Wiederfindungsrate

$S_{\text{rel.}}$: relative Standardabweichung

BW: bidest. Wasser

TW: Trinkwasser

λ : Meßwellenlänge

Die Wiederfindungsraten erreichten für die Hälfte der untersuchten Substanzen Werte von über 90 %. Der höchste Wert lag bei 101 % für 4-Aminotoluol und der niedrigste Wert bei 29 % für 2,6-Diaminotoluol. Ein Einfluß der Matrix konnte nicht festgestellt werden. Die Wiederfindungsraten in Trinkwasser und in bidest. Wasser unterschieden sich nur minimal.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei der Bestimmung in bidest. Wasser zwischen 1,29 % für 2-Amino-4-nitrotoluol und 8,79 % für 2,6-Diaminotoluol. Für den Großteil der Verbindungen lagen die Werte bei weniger als 2,5 %. In Trinkwasser wurden relative Standardabweichungen zwischen 0,94 % für 3,5-Dinitroanilin und 12,71 % für 4-Nitroanilin berechnet. Auch hier lag der Großteil der Werte bei unter 2,5 %. Beim Vergleich der relativen Standardabweichungen in den verschiedenen Matrices zeigte sich, daß ein Teil der

Verbindungen in Trinkwasser ein anderer Teil in bidest. Wasser eine höhere Präzision aufwies.

Auf die gleiche Weise wurden die Wiederfindungsraten für eine Analytkonzentration von $5,0 \mu\text{g/L}$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 aufgeführt. Die Wiederfindungsraten erreichten für mehr als die Hälfte der untersuchten Substanzen in beiden Matrices Werte von über 90 %. Der höchste Wert lag bei 102 % für 2-Amino-4-nitrotoluol in bidest. Wasser und der niedrigste Wert bei 9 % für 2,6-Diaminotoluol in Trinkwasser. Die Wiederfindungsraten in Trinkwasser und in bidest. Wasser unterschieden sich kaum.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei der Bestimmung in bidest. Wasser zwischen 1,36 % für 4-Nitroanilin und 5,85 % für 2,6-Diaminotoluol. Für den Großteil der Verbindungen lagen die Werte bei weniger als 4,0 %. In Trinkwasser wurden relative Standardabweichungen zwischen 0,94 % für 4-Chloranilin und 10,6 % für 2,4,5-Trichloranilin ermittelt. Der Großteil der Werte lag unter 3,0 %.

Beim Vergleich mit den Wiederfindungsraten bei verschiedenen Konzentrationen zeigten sich für die meisten Analyte keine wesentlichen Unterschiede. Bei 2,6DAT, 4ABPh und 2,4,5TCIA lagen die Wiederfindungsraten bei $5 \mu\text{g/L}$ deutlich niedriger.

Tab. 19: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen in bidest. Wasser und Trinkwasser (c = 5,0 µg/L), PRP-1-Vorsäule

Substanz	λ / nm	WDF in H ₂ O	S _{rel}	WDF in TW	S _{rel.}
		/ %	./ %	/ %	/ %
2,6DAT	210	15	5,85	9	6,96
2,4DA6NT	210	93	2,49	92	1,35
4NA	230	95	1,36	96	1,96
4AT	230	98	3,26	98	3,01
4CIA	230	99	1,89	98	0,94
2A4NT	230	102	2,12	100	2,99
3,5DNA	230	97	4,32	101	3,16
2NphA	230	85	4,59	87	2,39
2A4,6DNT	230	85	3,68	87	4,21
3,4DCIA	210	87	1,59	85	1,90
4ABPh	210	75	2,36	79	5,98
2,4,5TCIA	210	71	2,36	50	10,60

WDF: Wiederfindungsrate

S_{rel.}: relative Standardabweichung

BW: bidest. Wasser

TW: Trinkwasser

λ : Meßwellenlänge

Eine Bestimmung expliziter Durchbruchvolumina wurde nicht durchgeführt. Um das Sorptionsvermögen des PRP-1-Materials mit dem HR-P-Sorbens vergleichen zu können, wurde das Anreicherungs-volumen auf 300 mL erhöht. Die Konzentration der Analyten, wurde dabei, so gewählt, daß die angereicherte Analytmenge der Stoffmenge bei Anreicherung von 50 mL Wasserprobe entsprach. In Abb. 14 sind zwei, bei den unterschiedlichen Anreicherungs-volumina erhaltene Chromatogramme dargestellt. Die Zuordnung der Peaknummern ist in Tab. 20 aufgeführt. Man erkennt, daß der Durchbruch der früher eluierten Substanzen bereits bei einem Volumen \leq 300 mL stattfand, da deren Peaks nach Anreicherung von 300 mL deutlich kleiner waren. Außerdem trat bei erhöhtem Anreicherungs-volumen eine Peakverbreiterung auf.

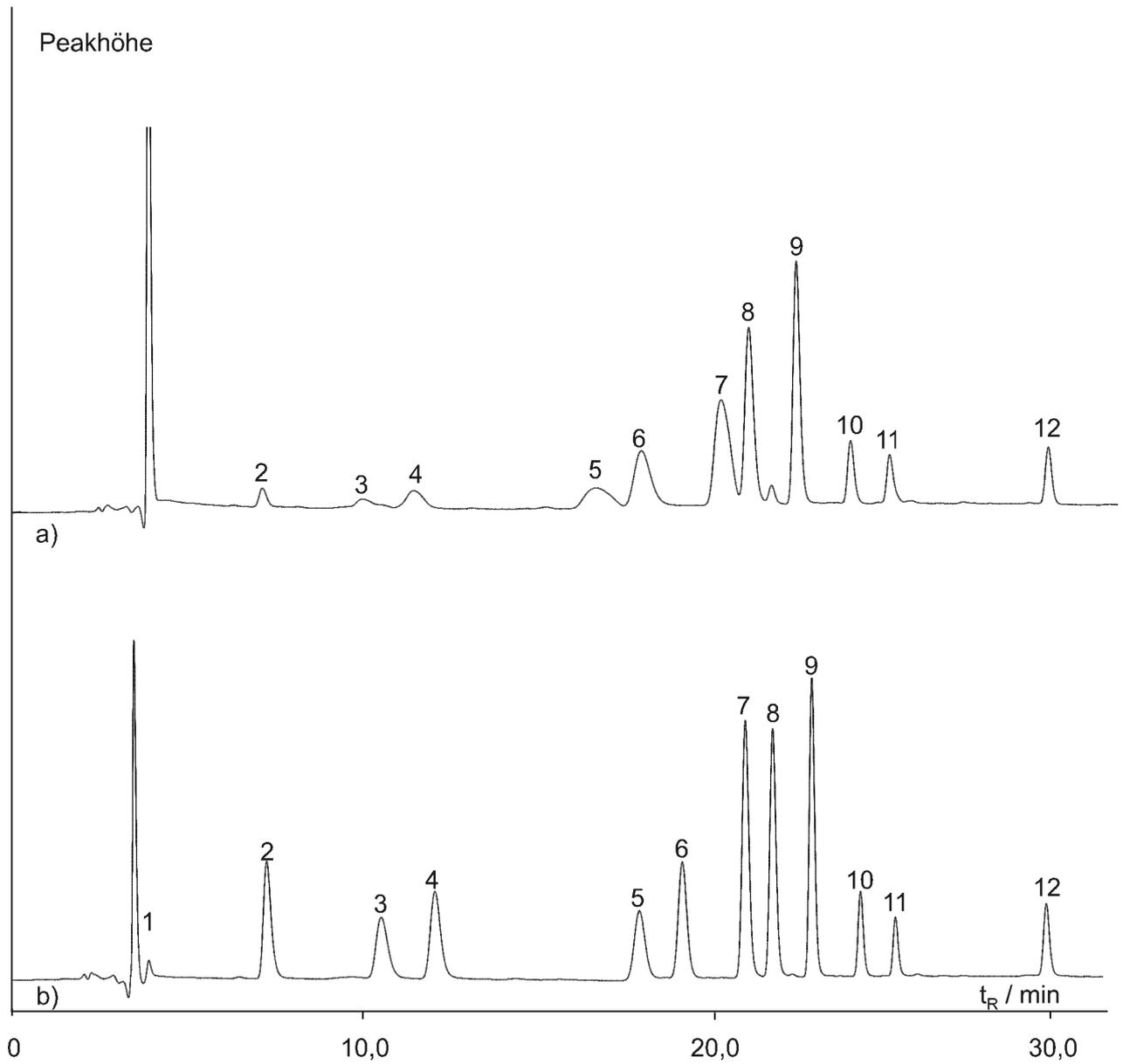


Abb. 14: Chromatogrammvergleich bei unterschiedlichen Anreicherungs volumina,

PRP-1-Vorsäule

a: Anreicherungs volumen 300 mL; b: Anreicherungs volumen 50 mL, Peakzuordnung s. Tab. 20

Tab. 20: Zuordnung der Peaknummern nach On-line-SPE/HPLC mit PRP-1-Festphasen

Substanz	Peak-Nr.	Substanz	Peak-Nr.
2,6DAT	1	3,5DNA	7
2,4DA6NT	2	2NphA	8
4NA	3	2A4,6DNT	9
4AT	4	3,4DCIA	10
4CIA	5	4ABPh	11
2A4NT	6	2,4,5TCIA	12

8 Pentafluorbenzylierung amphoterer aromatischer Amine

8.1 Reaktionsverlauf

Bei der hier untersuchten Pentafluorbenzylierung werden Aminobenzoesäuren zu Aminobenzoesäure-Pentafluorbenzylestern und Aminophenole zu Aminophenol-Pentafluorbenzylethern umgesetzt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitution nach einem S_N2 -Mechanismus (121). Das Reaktionsschema ist in Abb. 15 am Beispiel der Aminobenzoesäuren dargestellt.

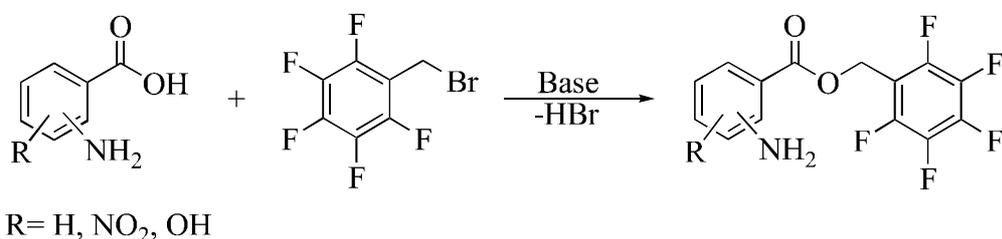


Abb. 15: Schema der Pentafluorbenzylierung amphoterer aromatischer Amine

Durch die in der Reaktionsmischung enthaltene Base (z.B. Kaliumcarbonat) wird die Säuregruppe deprotoniert. Das so entstandene Anion greift nun nukleophil am PFBBr an und substituiert dort das Bromid. Die Derivatisierung der Aminophenole erfolgt in analoger Weise. Hier wird die Hydroxygruppe des Phenols deprotoniert. Die Anwesenheit einer Base in der Reaktionsmischung ist zur Erhöhung der Reaktivität demnach unerlässlich. Ohne Zugabe einer Base wird die Aminogruppe amphoterer aromatischer Amine mit PFBBr zum sekundären Amin derivatisiert (122).

Die Pentafluorbenzylierung wird in der Literatur hauptsächlich zur Veresterung von Carbonsäuren (121, 123), oft Fettsäuren (124, 125), eingesetzt. Die Veretherung von Phenolen wurde ebenfalls häufig beschrieben (123, 126, 127). Hierbei kamen auch andere Pentafluorbenzylierungsmittel, wie Pentafluorbenzyl-Alkohol, zum Einsatz (128).

Bei den meisten Untersuchungen wurde die Derivatisierungs-Reaktion unter Wasserausschluß durchgeführt, u.a. um die Bildung unerwünschter Nebenprodukte zu vermeiden (126). Es gibt jedoch Beispiele, die unter Anwesenheit von Wasser durchgeführt wurden (129). Dort wurde z.T. mit Phasentransferkatalyse gearbeitet (130, 131).

8.2 Auswahl der Analyten

Die für die folgenden Untersuchungen ausgewählten Analyten sowie deren pK_S -Werte (aus 22) sind in Tab. 21 aufgelistet. Die dort verwendeten Abkürzungen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet.

Tab. 21: Ausgewählte Analyten mit Abkürzungen und pK_S -Werten

Substanz	Abkürzung	pK_S 1	pK_S 2
2-Aminobenzoesäure	2ABS	2,05	4,95
3-Aminobenzoesäure	3ABS	3,07	4,74
4-Aminobenzoesäure	4ABS	2,38	4,89
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	4A2HBS	2,74	5,84
2-Amino-4-nitrobenzoesäure	2A4NBS	a	3,70
5-Amino-2-nitrobenzoesäure	5A2NBS	a	a
2-Aminophenol	2AP	4,84	9,85
3-Aminophenol	3AP	4,21	9,92
4-Aminophenol	4AP	5,47	10,57
2-Amino-3-nitrophenol	2A3NP	-0,11	8,20
2-Amino-4-nitrophenol	2A4NP	2,71	7,09
2-Amino-5-nitrophenol	2A5NP	1,21	8,20
4-Amino-2-nitrophenol	4A2NP	3,34	7,44

a: keine experimentellen Daten in der Literatur verfügbar

Neben den in Tab. 21 aufgeführten Verbindungen wurden zunächst auch verschiedene Aminobenzolsulfonsäuren und Aminotoluolsulfonsäuren ausgewählt. Nach einigen Tests

stellte sich jedoch heraus, daß die Derivatisierung mit PFBBr bei diesen Verbindungen, zumindest bei den hier angewandten Versuchsbedingungen, nicht einsetzbar ist. Es konnten kein Derivate nachgewiesen werden. Die Pentafluorbenzylierung dieser Substanzgruppe wurde deshalb nicht weiter untersucht.

8.3 Herstellung der Standardlösungen

Zunächst wurden Stammlösungen der Einzelsubstanzen hergestellt. Jeweils 50 mg Substanz wurden in einen 50 mL-Kolben eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt ($c = 1 \text{ mg/mL}$). Aus diesen Stammlösungen (SL) wurden verschiedene Standardgemische (SG) hergestellt.

In einem 10 mL-Kolben wurde ein Aminobenzoesäure-Standardgemisch (GC-SG S) in Methanol hergestellt. Die jeweilige Menge an Stammlösung und die resultierenden Konzentrationen der Substanzen im SG sind in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: GC-SG S, Zusammensetzung und Konzentrationen

Substanz	Volumen an SL / mL (in 10 mL MeOH)	Konz. in GC-SG S / (mg/mL)	Substanz	Volumen an SL / mL (in 10 mL MeOH)	Konz. in GC-SG S / (mg/mL)
2ABS	1	0,1	4A2HBS	2	0,2
3ABS	1	0,1	2A4NBS	2	0,2
4ABS	1	0,1	5A2NBS	2	0,2

SL: Stammlösung

Auf dieselbe Art wurde ein Aminophenol-Standardgemisch (GC-SG P) hergestellt. Die Zusammensetzung dieses Gemisches ist in Tab. 23 aufgeführt. Da die Haltbarkeit der Stammlösung von 4-Aminophenol nur auf 1-2 Tage begrenzt war (dunkle Verfärbung der Lösung), wurde 4-Aminophenol aus den meisten Untersuchungen ausgeschlossen.

Tab. 23: GC-SG P, Zusammensetzung und Konzentrationen

Substanz	Volumen an SL / mL	Konz. in GC-SG S / (mg/mL)	Substanz	Volumen an SL / mL	Konz. in GC-SG S / (mg/mL)
2AP	1	0,1	2A4NP	2	0,2
3AP	1	0,1	2A5NP	2	0,2
4AP	1 ^a	0,1	4A2NP	2	0,2
2A3NP	2	0,2			

a: 4AP nicht immer enthalten

SL: Stammlösung

8.4 Vorläufige Durchführung der Derivatisierung

Vor der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Derivatisierung folgendermaßen durchgeführt:

In einem 10 mL-Vial mit Schraubdeckel wurde ein Standardgemisch (je 50-100 µg Substanz) in jeweils 2 mL eines Lösungsmittels (hier zunächst Acetonitril) mit 100 µL einer PFBBBr-Lösung ($c = 25 \mu\text{L/mL}$ in Aceton) und 100 mg K_2CO_3 versetzt und die Reaktionslösung 20 min auf 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom fast bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand in 4 mL Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 1 mL Cyclohexan 15 min extrahiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden mittels GC/ECD untersucht. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils 1 µL des Extraktes injiziert.

8.5 Gaschromatographische Trennung der Derivate

8.5.1 Verwendete Apparatur

Zur chromatographischen Trennung der Derivate wurde ein Gaschromatograph mit Autosampler-Einheit und Elektroneneinfangdetektor (ECD) verwendet. Die Meßdaten

wurden an eine Computereinheit weitergeleitet, wo sie mit der geeigneten Software ausgewertet werden konnten.

Als Trennsäule wurde eine unpolare DB 5 [(5%-phenyl)-methylpolysiloxan] verwendet, die sich durch einen breiten Einsatzbereich und geringes Säulenbluten auszeichnet. Die Säuleneigenschaften sind in Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 24: Spezifikation der verwendeten DB 5-Säule

Länge / m	Innendurchmesser / mm	Filmdicke / μm	Temperaturbereich / $^{\circ}\text{C}$
30	0,25	0,25	-60 – 325/350

8.5.2 Verwendete Temperaturprogramme

Um zu überprüfen, ob nach Durchführung der Reaktion Derivate mittels GC/ECD nachzuweisen waren, wurden zunächst je ein Aminobenzoesäure- und ein Aminophenol-Gemisch auf die oben beschriebene Weise (s. Kap. 8.4) in Aceton derivatisiert und eine isotherme Trennung bei 200 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Außerdem wurden die Standardgemische direkt eingespritzt, um Derivat-Peaks von möglicherweise auftretenden Peaks der Ausgangssubstanzen unterscheiden zu können. Nach der Derivatisierung wurden einige teilweise überlagerte Peaks erhalten, die nicht auf die Ausgangsverbindungen zurückzuführen waren. Dies zeigte, daß eine Pentafluorbenzylierung der Verbindungen erfolgt war. Um die Trennung zu verbessern, wurden zwei Temperaturgradienten-Programme entwickelt. Temperaturprogramm 1, das zur Trennung der Aminobenzoesäurederivate verwendet wurde, ist in Tab. 25 aufgeführt.

Tab. 25: Temperaturprogramm 1, Trennung der Aminobenzoesäurederivate

Zeit / min	Temperatur / $^{\circ}\text{C}$	Zeit / min	Temperatur / $^{\circ}\text{C}$
0,0	150	22,0	260
10,0	150	35,0	260
18,0	240		

Der Ausschnitt eines Chromatogramms, das nach der Derivatisierung des GC-SG S unter Verwendung dieses Temperaturprogramms aufgenommen wurde, ist in Abb. 16 dargestellt. Die Derivate werden innerhalb von 26 min getrennt. Der relativ große Abstand der Peaks hätte eine weitere Verringerung der Analysenzeit durch erneute Erhöhung der Ofentemperatur ermöglicht. Da bei dem verwendeten Temperaturprogramm jedoch bereits mit hohen Temperaturen gearbeitet wurde, wurde auf eine weitere Temperaturerhöhung verzichtet, um die Trennsäule zu schonen.

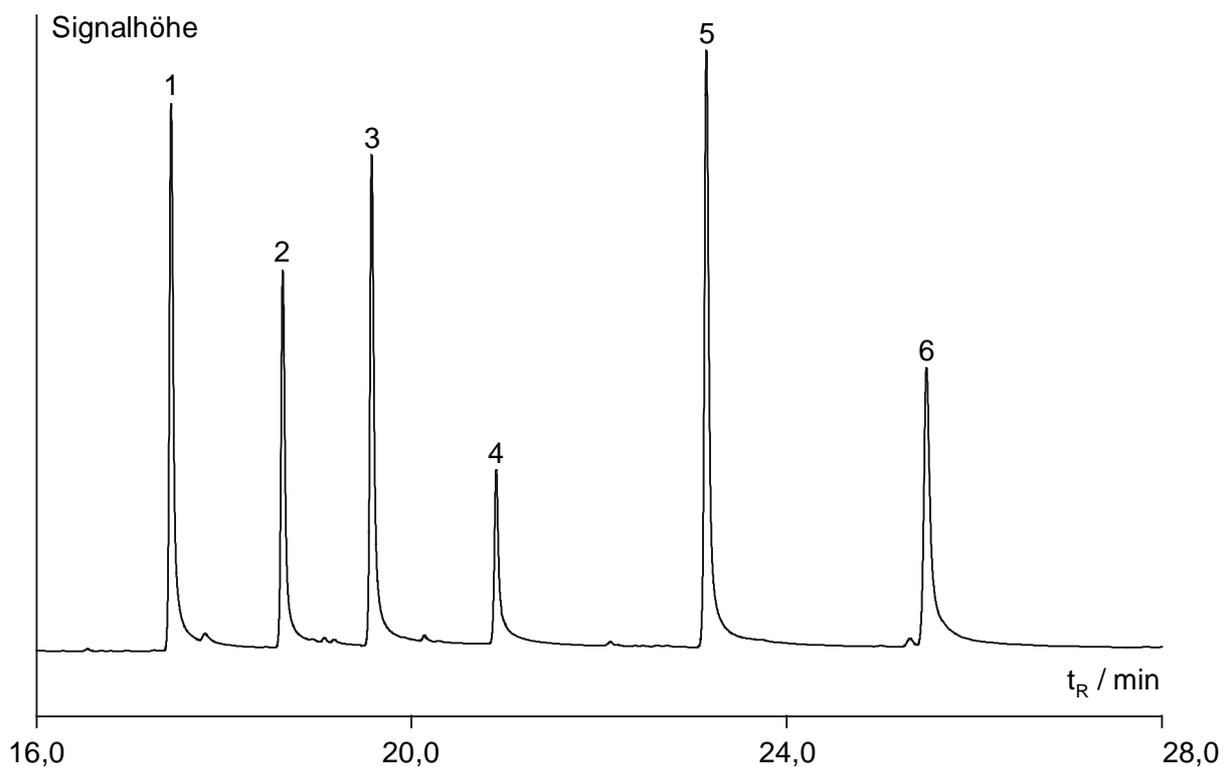


Abb. 16: Chromatogrammausschnitt der ABS-Derivate nach Pentafluorbenzylierung

Temperaturprogramm 1, Peak-Zuordnung s. Tab. 26

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, trat bei der chromatographischen Trennung der Derivate Peak-tailing auf, das auf die vorhandenen Aminogruppen zurückzuführen war, die zur Adsorption im chromatographischen System führen. Eine weitere Ursache war die verwendete Säule, die aufgrund langer Betriebszeit keine optimalen Trenneigenschaften mehr besaß.

Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden die Analyten einzeln derivatisiert und die Derivate im GC analysiert. Die Retentionszeiten und die Zuordnung der einzelnen Derivate sind in Tab. 26 aufgeführt.

Tab. 26: Retentionszeiten und Peak-Nr. der ABS-Derivate, Temperaturprogramm 1

PFBB-Derivat von	Peak-Nr.	t _R / min	PFBB-Derivat von	Peak-Nr.	t _R / min
2ABS	1	17,45	4A2HBS	4	20,92
3ABS	2	18,64	2A4NBS	5	23,16
4ABS	3	19,59	5A2NBS	6	25,51

Für die chromatographische Trennung der Aminophenolderivate wurde Temperaturprogramm 2 verwendet, das in Tab. 27 aufgeführt ist.

Tab. 27: Temperaturprogramm 2, Trennung der Aminophenolderivate

Zeit / min	Temperatur / °C	Zeit / min	Temperatur / °C
0	150	18,0	235
10,0	150	40,0	235

Der Ausschnitt eines Chromatogramms, das nach der Derivatisierung des GC-SG P unter Verwendung dieses Temperaturprogramms aufgenommen wurde, ist in Abb. 17 dargestellt. Die Trennung der Derivate erfolgt innerhalb von 24 min.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, trat auch bei der chromatographischen Trennung der AP-Derivate Peak tailing auf, das auf die gleichen Gründe wie bei den ABS-Derivaten zurückzuführen ist.

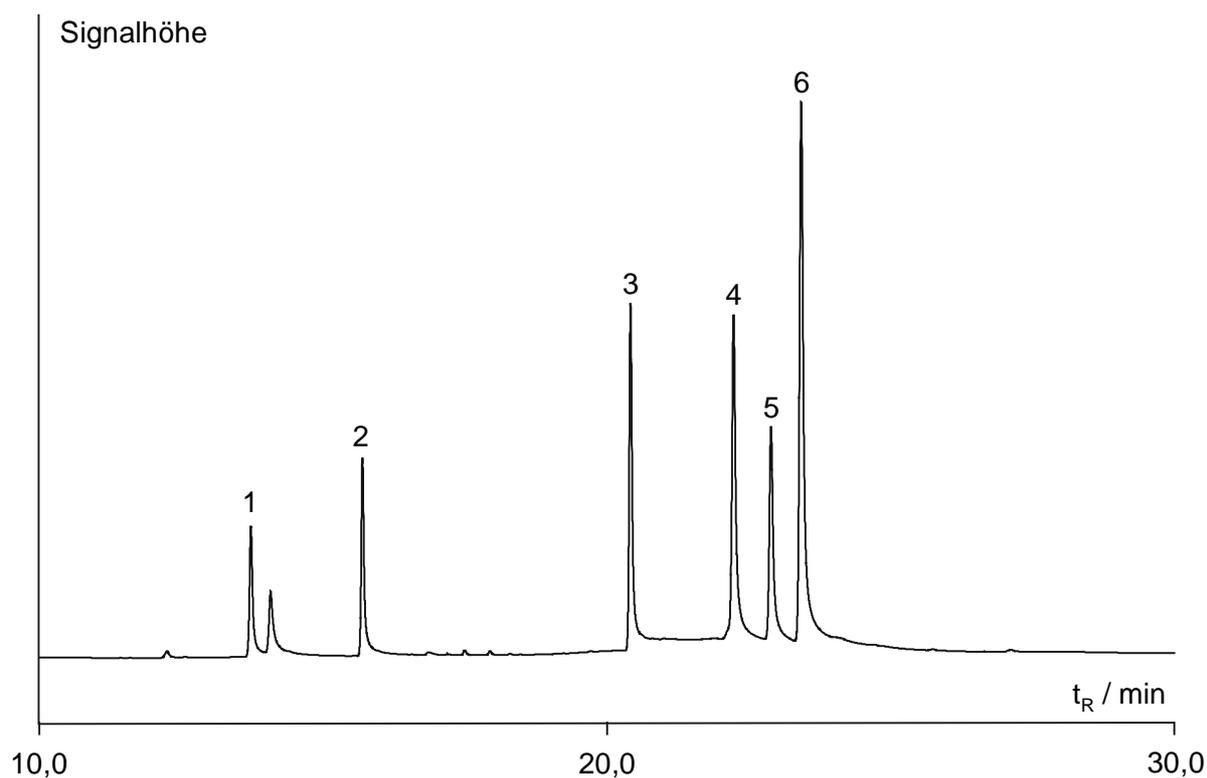


Abb. 17: Chromatogrammausschnitt der AP-Derivate nach Pentafluorbenzylierung
Temperaturprogramm 2, Peak-Zuordnung s. Tab. 28

Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden die Analyten einzeln derivatisiert und die Derivate im GC analysiert. Die so ermittelten Retentionszeiten und die Peak-Nr. der einzelnen Derivate sind in Tab. 28 aufgeführt.

Tab. 28: Retentionszeiten und Peak-Nr. der AP-Derivate, Temperaturprogramm 2

PFBB-Derivat von	Peak-Nr.	t_R / min	PFBB-Derivat von	Peak-Nr.	t_R / min
2AP	1	17,45	4A2NP	4	22,28
4AP	- ^a	15,41	2A4NP	5	22,93
3AP	2	15,70	2A5NP	6	23,47
2A3NP	3	20,43			

a: 4AP in diesem Gemisch nicht vorhanden

9 Optimierung des Verfahrens

9.1 Wahl des Lösungsmittels

Bei der hier durchgeführten Derivatisierung handelt es sich um eine nukleophile Substitution nach einem S_N2 -Mechanismus. Bei dieser Art von Reaktion hat die Wahl des verwendeten Lösungsmittels einen wichtigen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit (132). Protische Lösungsmittel wie Methanol sind nur wenig geeignet für S_N2 -Reaktionen, da sie über Wasserstoffbrückenbindungen das negativ geladene Nukleophil stabilisieren und so dessen Reaktivität herabsetzen. Zudem können sie wie beispielsweise Methanol selbst als Nukleophil reagieren und so eine Konkurrenzreaktion ermöglichen. Polare, aprotische Lösungsmittel dagegen sind für diese Reaktionen ausgezeichnet geeignet, da das Nukleophil hier nicht stabilisiert wird

Um ein geeignetes Lösungsmittel zu finden wurde die Derivatisierung in unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt. Ein Standardgemisch aus Aminobenzoesäuren wurde in jeweils 2 mL

- Methanol
- Acetonitril (MeCN)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Aceton

mit 50 μ L einer PFBBBr-Lösung und 50 mg Kaliumcarbonat versetzt und die Reaktionslösung 50 min auf 70 °C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben (s. Kap. 8.4). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. In Abb. 18 sind die erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte) in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel dargestellt.

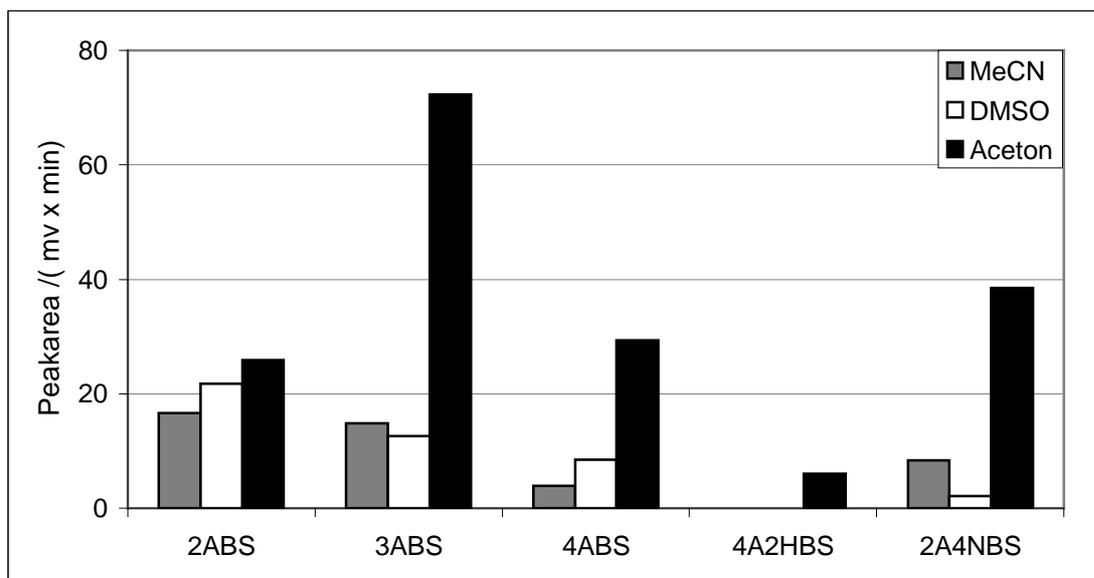


Abb. 18: Auswahl des geeigneten Lösungsmittels

Bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel konnten keine Derivate nachgewiesen werden. Dies liegt wie eingangs erwähnt daran, daß es sich bei Methanol um ein polares, protisches Lösungsmittel handelt und bestätigt den Reaktionsablauf nach einem S_N2 -Mechanismus. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, wurden die Reaktionsausbeuten teilweise stark vom jeweiligen Lösungsmittel beeinflusst. Beim Vergleich von Acetonitril mit DMSO konnte nicht festgelegt werden, welches der beiden Lösungsmittel besser geeignet war. Während bei der Verwendung von Acetonitril die Ausbeute der Derivatisierung von 3-Aminobenzoesäure und 2-Amino-4-nitrobenzoesäure höher war als beim Einsatz von DMSO, war es bei der Derivatisierung von 2-Aminobenzoesäure und 4-Aminobenzoesäure umgekehrt. Von 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure konnten in beiden Fällen keine Derivate nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Aceton war der Trend jedoch eindeutig. Die Peakflächen stiegen deutlich an. Aus diesem Grund wurde Aceton als Lösungsmittel für die Pentafluorbenzylierung der Analyten gewählt.

9.2 Zugabe von Pentafluorbenzylbromid

Weiterhin wurde der Einfluß der zugegebenen PFBBBr-Menge untersucht. Dazu wurde die Derivatisierung mit unterschiedlichen Zugabevolumina von PFBBBr-Lösung durchgeführt.

Zu 2 mL Aceton, die 50 mg Kaliumcarbonat enthielten, wurden 250 μL von GC-SG S zugesetzt. Von der PFBBBr-Lösung ($c = 12,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ in Aceton) wurden

- 20 μL
- 50 μL
- 70 μL
- 100 μL

hinzugefügt und die Mischung 50 min auf 70 °C erhitzt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bereits beschrieben (s. Kap. 8.4). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

In Abb. 19 sind die nach der Bestimmung mittels GC/ECD erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte) in Abhängigkeit vom zugesetzten Volumen an PFBBBr-Lösung dargestellt.

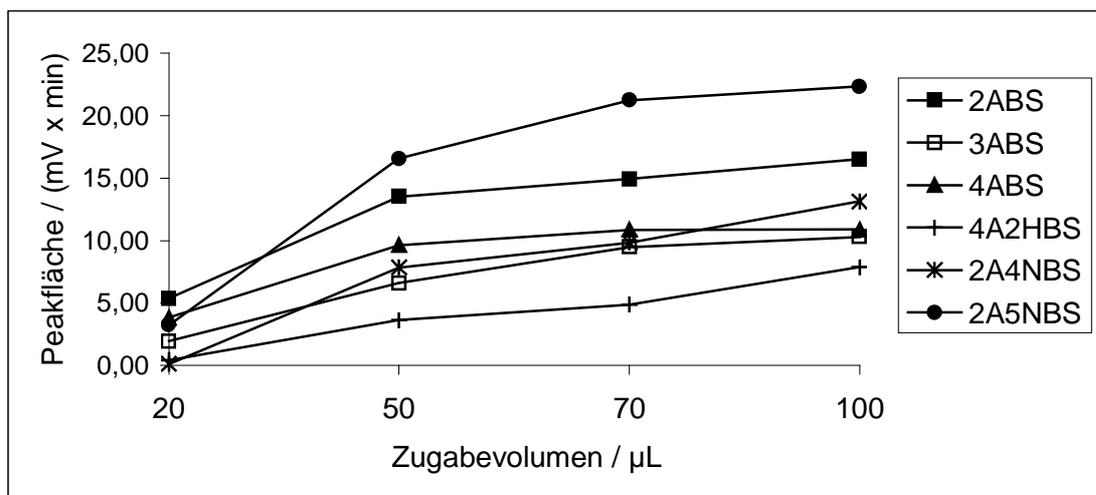


Abb. 19: Abhängigkeit der Peakflächen von der Zugabevolumen an PFBBBr

Während die Reaktionsausbeute bei der Steigerung des Zugabevolumens von 20 μL auf 50 μL deutlich anstieg, flachten die Kurven bei der weiteren Erhöhung der Zugabemenge leicht ab und erreichten für einige Verbindungen bei ca. 100 μL Zugabemenge einen Grenzwert. Obwohl dies nicht für alle Substanzen galt und eine weitere Erhöhung der Zugabemenge eventuell noch eine leichte Steigerung der Ausbeuten gebracht hätte, wurden 100 μL als Zusatzmenge für die folgenden Untersuchungen gewählt, weil ein zu großer PFBBBr-Überschuß die Bildung störender Nebenprodukte mit sich führte.

9.3 Auswahl der Base

In den Veröffentlichungen über die Derivatisierung von Carbonsäuren mit PFBBBr werden unterschiedliche Basen für die Reaktion eingesetzt (121, 123, 130, 133). Durch die Base soll die zu derivatisierende Substanz deprotoniert und so ihre Nucleophilie erhöht werden.

Um eine geeignete Base zu finden, wurde die Derivatisierung mit unterschiedlichen Basen durchgeführt. Dabei wurden Substanzen gewählt, deren Einsatz bereits in anderen Veröffentlichungen beschrieben wurde.

Jeweils 200 μL der GC-Standardgemische S und P wurden in 2 mL Aceton mit 100 μL PFBBBr-Lösung ($c = 12,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ in Aceton) versetzt. Als Base wurden

- Kaliumcarbonat (100 mg),
- Kaliumhydrogencarbonat (100 mg)
- Triethylamin (100 μL)

verwendet. Die Reaktion wurde 50 min bei 70 °C durchgeführt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bisher (s. Kap. 8.4). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. In Abb. 20 sind die erhaltenen Ergebnisse (Mittelwerte) am Beispiel der Aminophenole dargestellt. Während bei der Verwendung von K_2CO_3 und KHCO_3 außer bei 3-Aminophenol kein wesentlicher Unterschied der erhaltenen Peakflächen zu erkennen war, sanken die Reaktionsausbeuten beim Einsatz von Triethylamin besonders für 2-Aminophenol, 2-Amino-5-nitrophenol und 4-Amino-2-nitrophenol deutlich. Für die weiteren Versuche wurde K_2CO_3 verwendet.

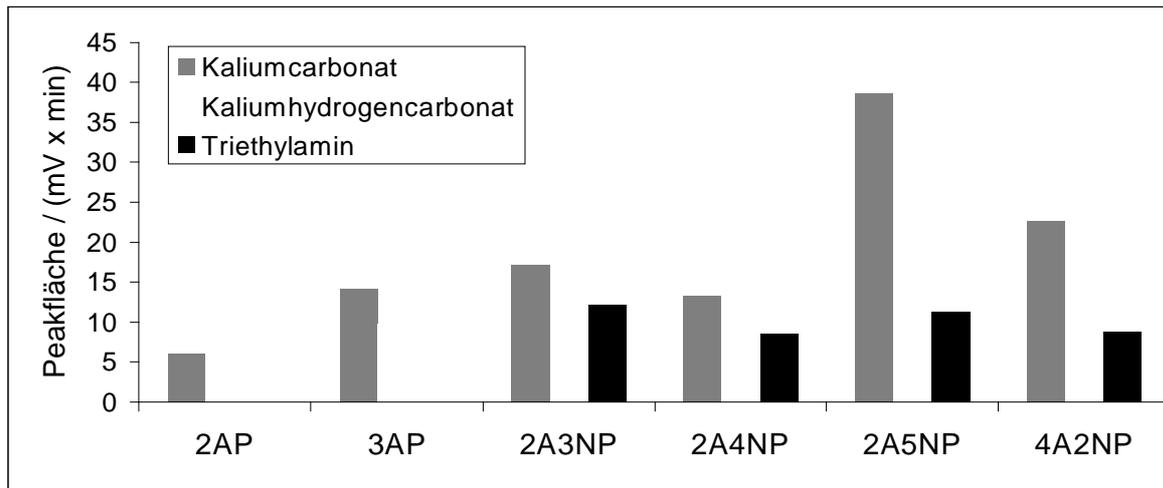


Abb. 20: Auswahl einer geeigneten Base

9.4 Zugabemenge der Base

Um zu ermitteln, welches die optimale Menge an K_2CO_3 für die Derivatisierung ist, wurde diese nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an K_2CO_3 durchgeführt.

Ein Phenol-Standardgemisch in 2 mL Aceton wurde nach Zugabe von 100 μ L PFBBBr-Lösung ($c = 12,5 \mu$ L/mL in Aceton) mit

- 10 mg
- 20 mg
- 50 mg
- 100 mg

K_2CO_3 versetzt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten wie oben beschrieben (s. Kap. 8.4). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. In Abb. 21 sind die Ergebnisse (Mittelwerte) graphisch dargestellt.

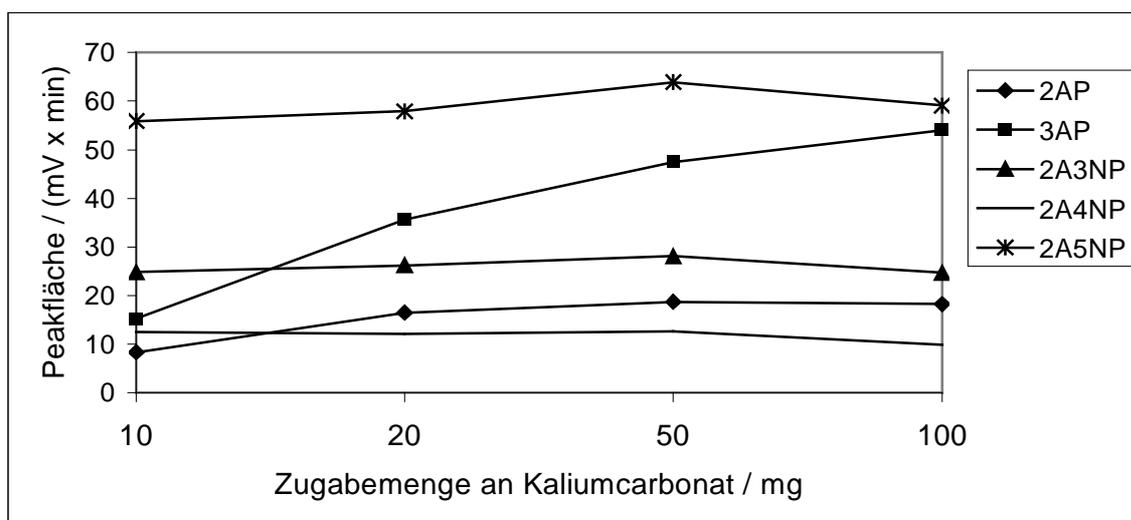


Abb. 21: Bestimmung der Zugabemenge an Kaliumcarbonat

Für die meisten Verbindungen hatte die Steigerung der K_2CO_3 -Menge kaum einen Einfluß auf die Reaktionsausbeute. Lediglich bei 3-Aminophenol war ein deutlicher Anstieg der Peakflächen durch eine erhöhte K_2CO_3 -Konzentration zu beobachten. Nach Zugabe von 50 mg K_2CO_3 wurde für die meisten Substanzen ein Maximalwert erreicht. Für die weiteren Versuche wurden 50 mg K_2CO_3 eingesetzt.

9.5 Zugabe von Kronenether

In einigen Veröffentlichungen (121, 123, 126, 128) wird zu der Reaktionslösung zusätzlich ein Kronenether zugesetzt. Dieser hat die Funktion, das Kation der verwendeten Base zu komplexieren. Dadurch wird die Reaktivität des Säure- bzw. Phenol-Kations für eine nukleophile Substitution des Bromid-Ions gesteigert. Bei der Verwendung von K_2CO_3 wird dazu 18-Krone-6 verwendet. Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit eines Kronenethers einen Einfluß auf die Derivatisierungsausbeute hat, wurde die Reaktion bei verschiedenen Kronenetherkonzentrationen durchgeführt.

Je 250 μ l GC-SG S bzw. 200 μ l GC-SG P wurden in 2 mL Aceton mit 100 μ L PFBBBr-Lösung ($c = 12,5 \mu$ L/mL in Aceton) und 50 mg K_2CO_3 versetzt. Zusätzlich wurden

- 0 μL
- 50 μL
- 100 μL

einer 18-Krone-6-Lösung ($c = 5 \text{ mg/mL}$ in Aceton) zugegeben und die Derivatisierung wie beschrieben durchgeführt (s. Kap. 8.4). In Abb. 22 sind die Ergebnisse (Mittelwerte) für einige ausgewählte Verbindungen dargestellt. Während bei einigen der Substanzen die Anwesenheit des Kronenethers keinen oder nur geringen Einfluß auf die Derivatisierungsausbeute hatte, stieg die Größe der Peakflächen bei anderen Verbindungen wiederum stark an. Die weitere Verwendung von 18-K-6 erschien deshalb sinnvoll.

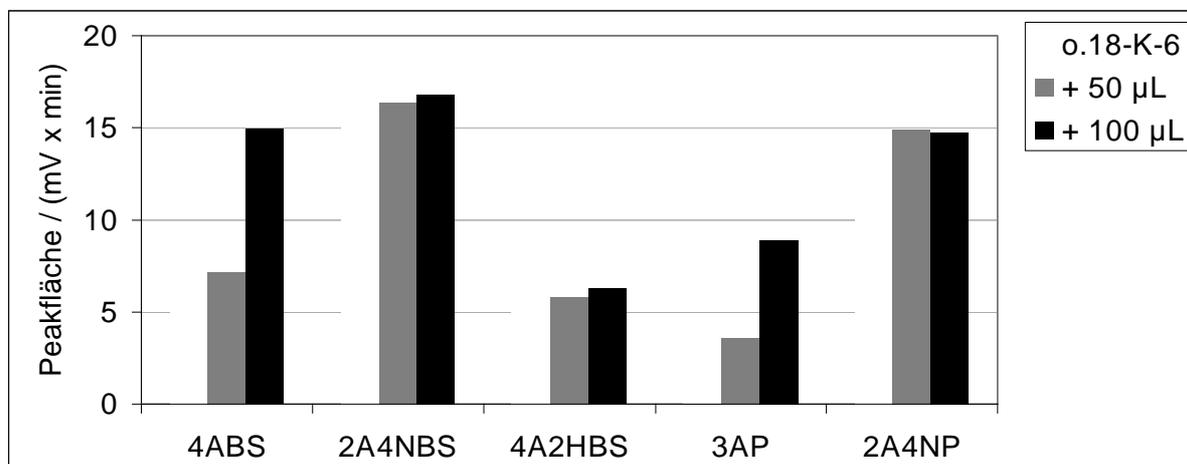


Abb. 22: Einfluß des Zugabevolumens von 18-Krone-6-Lösung auf die Derivatisierung

Für den weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde eine Reagenzlösung hergestellt, die PFBBBr ($c = 25 \text{ } \mu\text{L/mL}$ Aceton) und 18-K-6 ($c = 10 \text{ mg/L}$ Aceton) enthielt. Von dieser Lösung wurden jeweils 50 μL zugesetzt.

9.6 Reaktionszeit und Temperatur

In der Literatur sind zahlreiche Versuchsvorschriften für die Pentafluorbenzylierung von Carbonsäuren und Phenolen beschrieben. Die Reaktionen werden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei höheren Temperaturen bis zu 100 °C (122) durchgeführt. Die Reaktionszeiten variieren ebenfalls sehr stark. Um für die hier untersuchten Substanzen die

geeignete Temperatur und Reaktionszeit zu finden, wurde die Derivatisierung bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lang durchgeführt.

Je 250 μL GC-SG S wurden in 2 mL Aceton mit 50 mg K_2CO_3 und 50 μL Reagenzlösung (s. Kap. 9.5) versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (RT), bei 50 °C und bei 70 °C unterschiedlich lang durchgeführt. Anschließend wurden die Lösungen wie beschrieben (s. Kap. 8.4) aufgearbeitet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

In Abb. 23 sind die Mittelwerte der erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen am Beispiel der 2-Aminobenzoesäure dargestellt. Der Verlauf dieser Graphen entsprach weitestgehend dem der übrigen Analyten. Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf 50 bzw. 70 °C die Reaktion erheblich beschleunigte. Während die Peakflächen bei 70 °C bereits nach 30 min einen Maximalwert erreichten, wurde dieser Wert bei Raumtemperatur auch nach 90 min noch nicht erreicht. Bei 50 °C wurde der Maximalwert erst etwas später erreicht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Reaktion 30 min bei 70 °C durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, daß die verwendeten Vials fest verschlossen waren, da das Aceton bei dieser Temperatur äußerst flüchtig war.

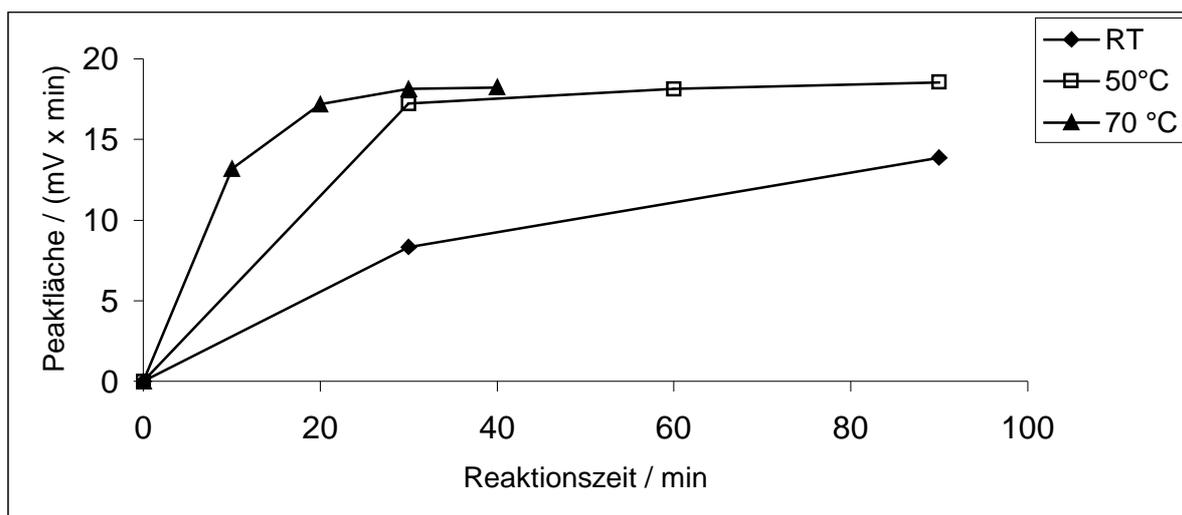


Abb. 23: Einfluß von Temperatur und Reaktionszeit am Beispiel von 2ABS

9.7 Extraktion

Es war zu klären, ob eine einmalige Behandlung mit 1 mL Cyclohexan für eine vollständige Extraktion ausreichend war. Die Standardgemische S und P wurden derivatisiert und die Reaktionslösungen dreimal mit jeweils 1 mL Cyclohexan extrahiert. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Extraktionsraten wurden folgendermaßen berechnet:

Die Peakflächen des jeweiligen Derivats, die nach den 3 Extraktionsschritten gemessen wurden, wurden addiert. Der so erhaltene Wert wurde als 100 %-Wert festgelegt. Die Peakfläche, die nach dem ersten Extraktionsschritt erhalten wurde, wurde durch den 100 %-Wert dividiert und in Prozent umgerechnet. Die Mittelwerte der nach der chromatographischen Trennung erhaltenen Peakflächen, die Extraktionsraten nach einmaliger Extraktion und deren relative Standardabweichungen sind in Tab. 29 aufgeführt.

Tab. 29: Extraktionsraten der Pentafluorbenzyllderivate

PFBB-Derivat von	Peakfläche / (mV · min)			Extraktionsrate (1. Extr.) / %	s _{rel.} / %
	1. Extr.	2. Extr.	3. Extr.		
2ABS	21,42	0,54	n.n.	98	1,4
3ABS	16,97	0,55	n.n.	97	4,5
4ABS	23,00	0,75	n.n.	97	2,7
4A2HBS	16,43	0,86	n.n.	95	1,9
2A4NBS	39,36	0,00	n.n.	99	1,2
2AP	7,27	0,16	n.n.	98	1,4
3AP	9,34	0,26	n.n.	97	3,1
2A3NP	20,99	0,41	n.n.	98	4,7
2A4NP	15,96	0,60	n.n.	96	2,2
2A5NP	51,70	1,96	n.n.	96	2,5
4A2NP	25,76	3,38	0,55	87	4,8

s_{rel.}: relative Standardabweichung

n.n.: nicht nachweisbar

Die Extraktionsraten lagen, außer für das Derivat von 4-Amino-2-nitrophenol, für alle Substanzen bei mindestens 95%. Eine einmalige Extraktion mit 1 mL Cyclohexan wurde deshalb als ausreichend gewertet. Die relativen Standardabweichungen lagen bei dieser Untersuchung zwischen 1,2 und 4,5 % für die Aminobenzoesäure-Derivate und zwischen 1,4 % und 4,8 % für die Aminophenol-Derivate. Diese hohen Werte für Aminophenole lagen an der signifikanten Abweichung der Meßwerte einer Analysenprobe von den übrigen zwei Proben.

9.8 Optimierte Durchführung der Derivatisierung

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Verbindungen unter folgenden optimierten Bedingungen pentafluorbenzyliert:

In einem 10 mL-Vial wurde ein Standardgemisch (je 50-100 µg Substanz) in jeweils 2 mL Aceton mit 50 µL einer Reagenzlösung ($c_{(\text{PFBB}_r)} = 25 \text{ µL/mL}$; $c_{(18\text{-K-6})} = 10 \text{ mg/mL}$ in Aceton) sowie 50 mg K_2CO_3 versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min im Wasserbad bei 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom fast bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand in 4 mL Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 1 mL Cyclohexan 15 min extrahiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden mittels GC/ECD untersucht. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils 1 µL des Extraktes injiziert.

9.9 Beeinflussung der Reaktionsausbeute durch Wasser

Da bei der Anreicherung der amphoteren aromatischen Amine aus wäßrigen Proben stets zumindest geringe Mengen an Wasser zurückbleiben, war es notwendig zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Wasser die Derivatisierungsreaktion beeinflusst.

Ein Aminophenol-Gemisch wurde derivatisiert, wobei

- kein Wasser
- 50 µL Wasser
- 250 µL Wasser

zur Reaktionslösung zugesetzt wurden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt. Durch die Zugabe von 50 μL Wasser wurde die Derivatisierungsausbeute kaum beeinflusst. Bei einigen Verbindungen kam es sogar zu einer leichten Vergrößerung der Peakflächen. Nach Zugabe von 250 μL Wasser wurden, außer bei 2-Amino-3-nitrophenol, teilweise stark verringerte Peakflächen erhalten.

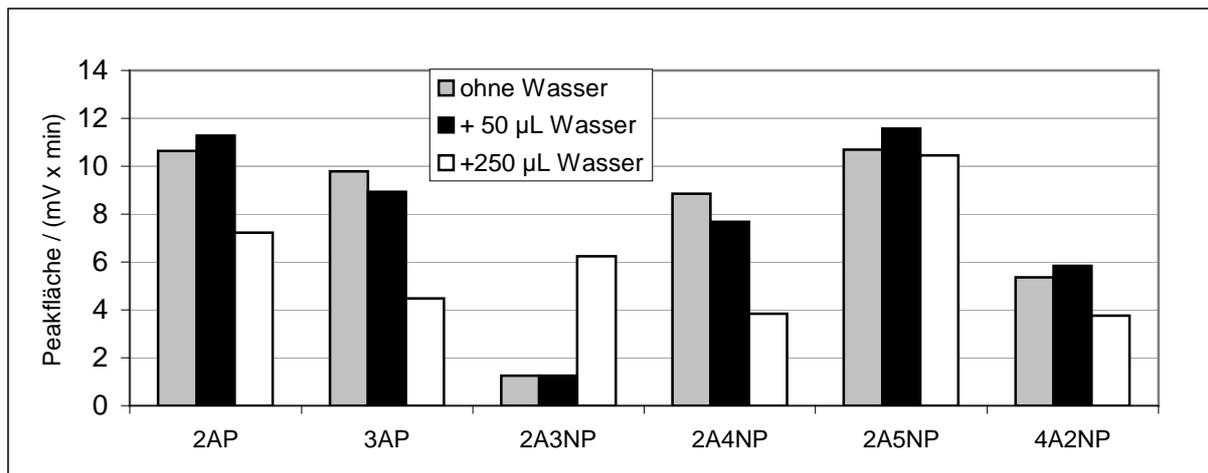


Abb. 24: Einfluß von Wasser auf die Derivatisierungsreaktion

Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Wasser als protisches Lösungsmittel die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion bekanntermaßen nicht begünstigt.

10 Bestimmung von Verfahrensparametern

10.1 Massenspektrometrische Untersuchung der Derivate

Zur Identifizierung der entstandenen Pentafluorbenzyl-Derivate wurden GC/MS-Messungen durchgeführt. Die Meßbedingungen sind im Anhang (Kap. 15.1) aufgeführt. Abb. 25 zeigt beispielhaft das Massenspektrum des Derivats von 2-Aminobenzoessäure.

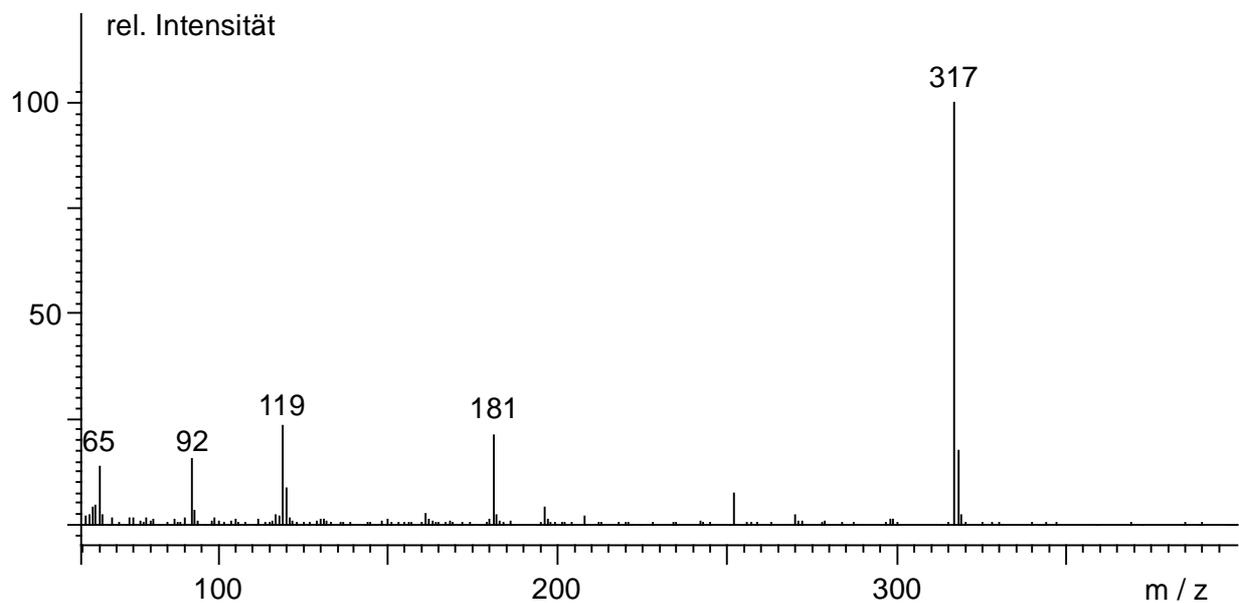


Abb. 25: Massenspektrum des Pentafluorbenzylderivats von 2ABS

Der M⁺-Peak mit m/z = 317 stellte gleichzeitig auch das intensivsten Massenfragment dar. Die Abspaltung des Aminobenzoessäure-Restes führte zur Bildung des Pentafluorbenzyl-Kations mit m/z = 181.

In Abb. 26 ist das Massenspektrum des Derivats von 4-Amino-2-nitrophenol zu sehen mit einem M⁺-Peak bei m/z = 334. Hier stellte das durch die Abspaltung des Pentafluorbenzyl-Restes entstandene Massenfragment mit m/z = 153 den Basispeak dar.

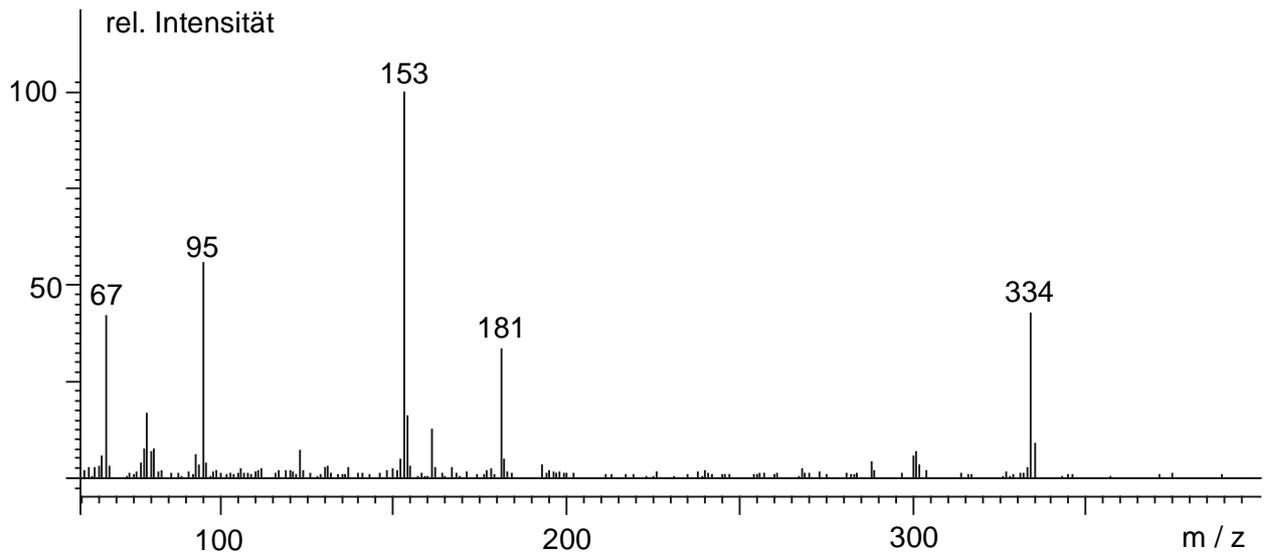


Abb. 26: Massenspektrum des Pentafluorbenzylderivats von 4A2NP

In Tab. 30 sind die MS-Daten der Pentafluorbenzyl-Derivate zusammengefasst. Bei dem Großteil der Verbindungen entsprach der M^+ -Peak zugleich dem Basispeak. Bei den Aminonitrophenolen entstand dieser durch Abspaltung des Pentafluorbenzyl-Restes.

Tab. 30: MS-Daten für pentafluorbenzilyerte amphotere aromatische Amine

Substanz	Derivat	m/z	m/z
		(100 %)	(M ⁺)
2ABS	2-Aminobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	317	317
3ABS	3-Aminobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	317	317
4ABS	4-Aminobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	317	317
4A2HBS	4-Amino-2-hydroxybenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	333	333
2A4NBS	2-Amino-4-nitrobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	362	362
5A2NBS	5-Amino-2-nitrobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	362	362
2AP	2-Aminophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	289	289
3AP	3-Aminophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	289	289
4AP	4-Aminophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	289	289
2A3NP	2-Amino-3-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	153	334
2A4NP	2-Amino-4-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	153	334
2A5NP	2-Amino-5-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	153	334
4A2NP	4-Amino-2-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	153	334

10.2 Kalibrierung des Verfahrens zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

10.2.1 Aminobenzoesäuren

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde, unter Verwendung von GC-SG S und einer im Verhältnis 1:10 verdünnten Lösung dieses Gemischs eine Kalibrierung des Verfahrens durchgeführt. Von 2-Aminobenzoesäure, 3-Aminobenzoesäure und 4-

Aminobenzoesäure wurden jeweils 0,5 µg, 1,0 µg, 5,0 µg, 10,0 µg und 15,0 µg derivatisiert, von den übrigen Verbindungen jeweils die doppelte Menge an Substanz. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß jeweils 10 Datenpaare zur Berechnung der Kenndaten nach DIN 38402-51 zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind in Tab. 31 aufgeführt.

Tab. 31: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der ABS nach Pentafluorbenzylierung

Derivat von	Ordinatenabschnitt / (mV x min)	Steigung / (mV x min)	s_x / µg	V_k / %	X_B / ng
2ABS	-0,164	0,804	0,094	1,49	0,31
3ABS	-0,184	0,546	0,318	5,04	1,04
4ABS	-0,187	0,696	0,118	2,70	0,56
4A2HBS	-0,961	0,264	1,940	14,74	5,79
2A4NBS	-0,323	0,456	0,502	3,99	1,64
5A2NBS	-0,604	0,430	0,643	5,11	2,08

V_k : Variationskoeffizient

s_x : Verfahrensstandardabweichung

X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 1,49 % für 2-Aminobenzoesäure und 14,74 % für 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 6 %. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 0,31 ng für 3-Aminobenzoesäure und 5,79 ng für 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure, bezogen auf die injizierte Menge an Analyt. Bei einem Großteil der Verbindungen lag X_B bei unter 2,0 ng.

10.2.2 Aminophenole

Für die Kalibrierung wurde GC-SG P 1:10 verdünnt, so daß die Konzentrationen der Analyten 0,01 µg/µL bzw. 0,02 µg/µL betragen . Davon wurden

- 0,5 µg bzw. 1,0 µg
- 1,0 µg bzw. 2,0 µg
- 1,5 µg bzw. 3,0 µg
- 2,0 µg bzw. 4,0 µg
- 2,5 µg bzw. 5,0 µg

derivatisiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß jeweils 10 Datenpaare zur Berechnung der Kenndaten nach DIN 38402-51 zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind in Tab. 32 aufgeführt.

Tab. 32: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der AP nach Pentafluorbenzylierung

Derivat von	Ordinaten- abschnitt / (mV x min)	Steigung / (mV x min)	s_x / µg	V_k / %	X_B / ng
2AP	0,0239	0,218	0,072	4,82	0,236
3AP	-0,0435	0,352	0,071	4,71	0,231
4AP	-0,0090	0,744	0,080	5,38	0,263
2A3NP	-0,0325	0,204	0,048	3,19	0,156
2A4NP	-0,0313	0,150	0,070	4,69	0,229
2A5NP	-0,1430	0,525	0,062	4,15	0,203
4A2NP	-0,0680	0,234	0,050	3,36	0,164

V_k : Variationskoeffizient

s_x : Verfahrensstandardabweichung

X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 3,19 % für 2-Amino-3-nitrophenol und 5,38 % für 4-Aminophenol. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 5 %. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 0,16 ng für 2-Amino-3-nitrophenol und 0,26 ng für 4-Aminophenol, bezogen auf die injizierte Menge an Analyt.

In Abb. 27 ist beispielhaft die Kalibriergerade für 2-Amino-4-nitrobenzoesäure mit oberem und unterem Vertrauensbereich dargestellt. Diese war mit einem Variationskoeffizienten von 4,71 %, wie auch die Kalibriergeraden der übrigen Verbindungen, linear im Sinne der verwendeten DIN.

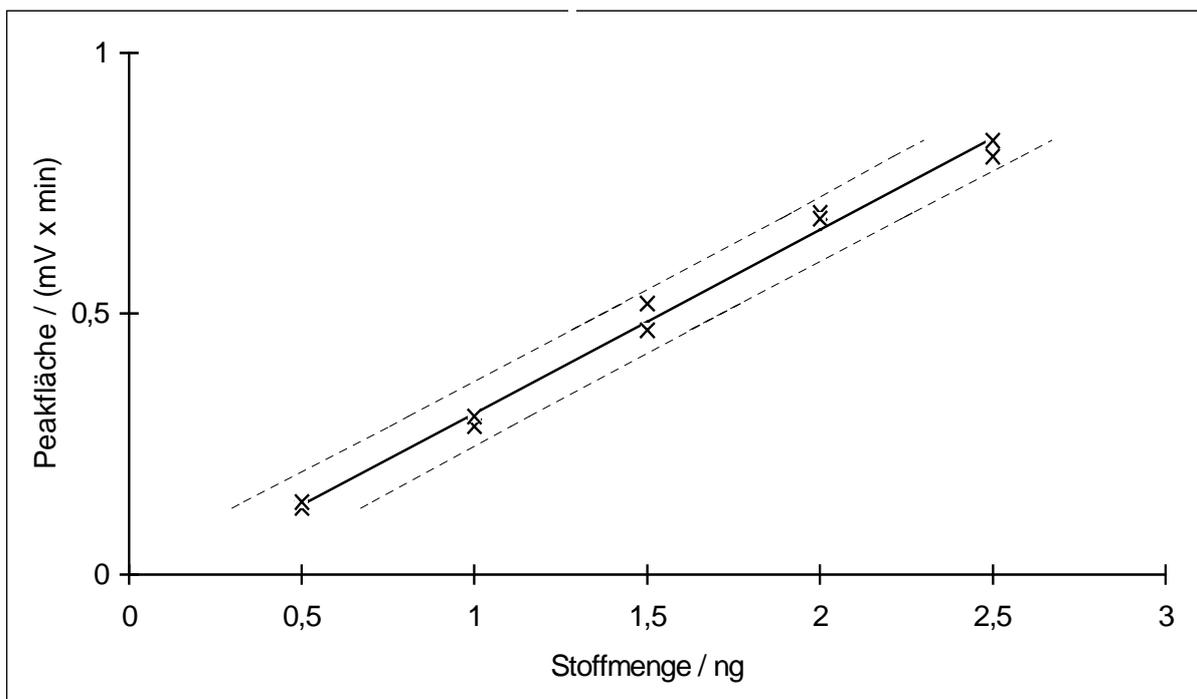


Abb. 27: Kalibriergerade für 3-Aminophenol nach Pentafluorbenzylierung

11 Iodierung der Pentafluorbenzyllderivate

11.1 Allgemeines

Um die Empfindlichkeit der Analyse bei der ECD-Detektion noch weiter zu erhöhen und das größtenteils durch die in den PFB-Derivaten verbliebenen Aminogruppen hervorgerufene Peaktailling zu reduzieren, wurde eine nachfolgende Derivatisierung der PFBB-Derivate mit Iod untersucht.

Bei der hier durchgeführten Reaktion werden die Aminogruppen nach einer Diazotierung in einer SANDMEYER-ähnlichen Reaktion durch Iod substituiert. Der Ablauf dieser Reaktion ist in Abb. 28 schematisch dargestellt.

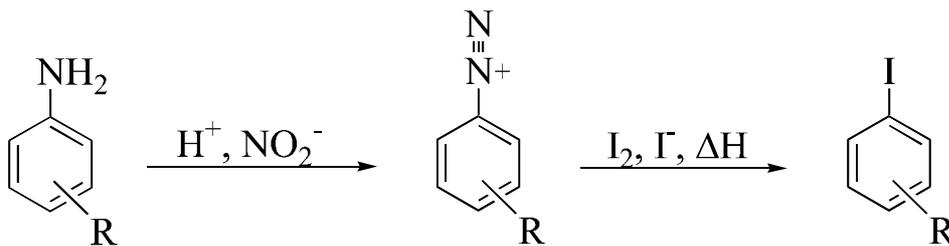


Abb. 28: Reaktionsschema der Derivatisierung aromatischer Amine mit Iod

Der erste Schritt der Derivatisierung besteht aus der Umsetzung des jeweiligen Amins mit Nitrit in saurem Medium zu den entsprechenden Diazonium-Ionen. Im zweiten Schritt werden die Diazonium-Ionen durch Zugabe eines Iodierungsreagens und anschließendes Erwärmen zu den iodierten Produkten umgesetzt. Bei dem Iodierungsreagens handelt es sich um eine Lösung aus Iod und Iodid.

HAAS et al. (134) haben die Iodierung aromatischer Amine am Beispiel von 13 Abbauprodukten nitroaromatischer Explosivstoffe untersucht. Als Mineralsäure für die Diazotierung verwendeten sie Salzsäure. Eine Verbesserung der Derivatisierungsausbeuten und eine deutliche Verringerung störender Nebenprodukte wurde durch den Ersatz der Salzsäure durch Iodwasserstoffsäure erreicht (22). Bei der Verwendung von

Iodwasserstoffsäure ist es nicht mehr notwendig, ein zusätzliches Iodierungsreagenz einzusetzen, da sich bereits eine ausreichende Menge Iod aus der Säure bildet. 55 aromatische Amine konnten so erfolgreich derivatisiert werden (135).

11.2 Vorläufige Durchführung der Iodierung

Für die Iodierung wurde zunächst die Derivatisierungsvorschrift nach (22) verwendet, die sich bei der Iodierung der nicht amphoteren Aniline bewährt hat. Die Derivatisierung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach der Pentafluorbenzylierung wurde die Aceton-Lösung im Stickstoffstrom bei 40 °C bis auf ein Volumen $\leq 0,5$ mL eingeeengt. Zur Probe wurden 5 mL bidest. Wasser gegeben und dieser Lösung 200 μL Iodwasserstoffsäure (55 %) und 500 μL Natriumnitrit-Lösung ($c = 10$ g/L) zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min wurde 1 mL Amidosulfonsäure-Lösung ($c = 50$ g/L) zugefügt und die Lösung 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 5 min im Wasserbad bei 100 °C erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Zerstörung des verbliebenen Iodüberschusses wurde die Lösung mit 250 μL einer gesättigten Natriumsulfit-Lösung versetzt und anschließend mit 500 μL Natronlauge ($c = 10$ mol/L) alkalisiert. Die Derivate wurden mit 2 mL Cyclohexan 15 min extrahiert und die erhaltenen Extrakte mittels GC/ECD bzw. GC/MS analysiert.

11.3 Gaschromatographische Trennung der Derivate

11.3.1 Trennung der iodierten Aminobenzoesäurederivate

Zur Trennung der iodierten Aminobenzoesäurederivate wurde Temperaturprogramm 1 (s. Kap. 8.4.2) verwendet. Die Peakzuordnung erfolgte durch Iodierung und gaschromatographische Trennung der Einzelsubstanzen. In Abb. 29 sind vergleichend zwei Chromatogramme, die mit diesem Temperaturprogramm aufgenommen wurden, im selben Maßstab dargestellt. Die Peakzuordnung und die Retentionszeiten der iodierten Verbindungen sind in Tab. 33 aufgeführt. Chromatogramm a wurde nach der Pentafluorbenzylierung eines

Aminobenzoesäure-Gemischs erhalten, Chromatogramm b nach zusätzlicher Iodierung der Derivate.

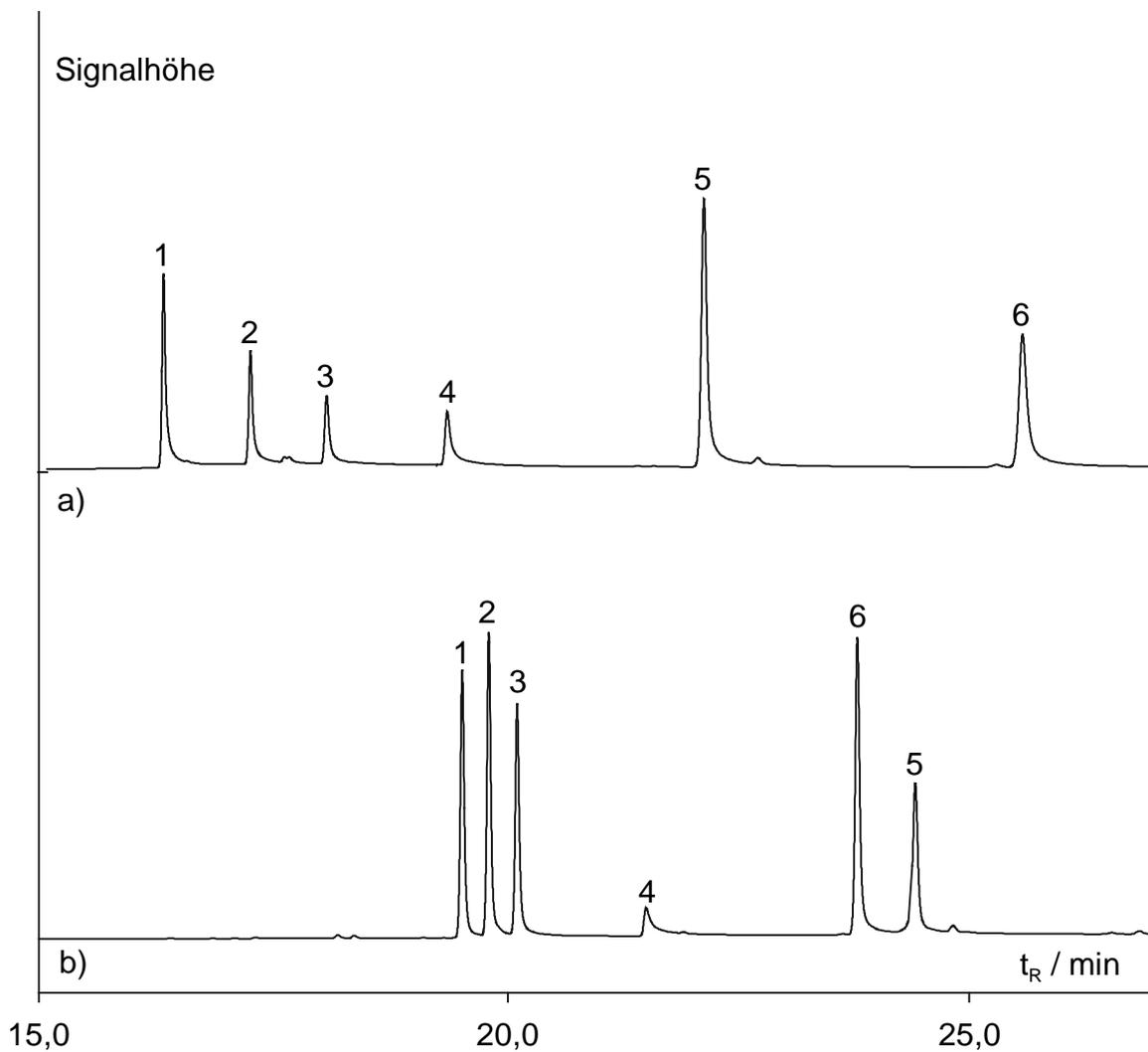


Abb. 29: Chromatogrammvergleich der Aminobenzoesäurederivate

a: nach Pentafluorbenzylierung; b: nach Pentafluorbenzylierung und Iodierung;
Peakzuordnung s. Tab. 33, Temperaturprogramm 1 (s. Kap. 8.5.2)

Es ist zu erkennen, daß sich die Peakform nach Iodierung der Derivate verbessert hat. Da das nach Pentafluorbenzylierung auftretende Peaktailing zum größten Teil durch die verbliebenen Aminogruppen verursacht wurde, konnte die Derivatisierung diese Erwartungen erfüllen. Die Peakintensitäten erhöhten sich trotz des Einbringens eines weiteren elektronenziehenden Substituenten jedoch nicht. Bei den Iodderivaten von 2-Amino-4-nitrobenzoesäure und 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure kam es im Vergleich zu den uniodierten Derivaten sogar zu einer Verringerung der Peakintensitäten. Nach Umsetzung der PFB-Derivate waren keine

uniodierten Pentafluorbenzyl-Derivate mehr zu finden. Dies läßt den Schluß zu, daß während der Iodierungsreaktion ein Teil der PFB-Derivate durch Nebenreaktionen, wie z.B. Hydrolyse, verloren gingen. Diese Nebenprodukte waren mittels GC/ECD nicht nachzuweisen.

Tab. 33: Retentionszeiten und Peak-Nr. der ABS-Derivate

PFB-I-Derivat von	Peak-Nr.	t _R / min
2ABS	1	19,51
3ABS	2	19,80
4ABS	3	20,10
4A2HBS	4	21,48
2A4NBS	5	24,35
5A2NBS	6	23,73

11.3.2 Trennung der iodierten Aminophenolderivate

Zur Trennung der iodierten Aminophenolderivate wurde das in Tab. 34 aufgeführte Temperaturprogramm 3 verwendet. Die Peakzuordnung erfolgte durch Iodierung der Einzelsubstanzen und anschließende gaschromatographische Trennung.

Tab. 34: Temperaturprogramm 3, Trennung der iodierten Aminophenolderivate

Zeit / min	Temperatur / °C	Zeit / min	Temperatur / °C
0	150	27,0	230
10,0	150	30,0	260
20,0	230	35,0	260

In Abb. 30 sind vergleichend zwei Chromatogramme, die mit diesem Temperaturprogramm aufgenommen wurden, im selben Maßstab dargestellt. Die Peakzuordnung und die Retentionszeiten der iodierten Verbindungen sind in Tab. 35 aufgeführt. Chromatogramm b

wurde nach der Pentafluorbenzylierung eines Aminophenol-Gemischs erhalten, Chromatogramm a nach zusätzlicher Iodierung der Derivate.

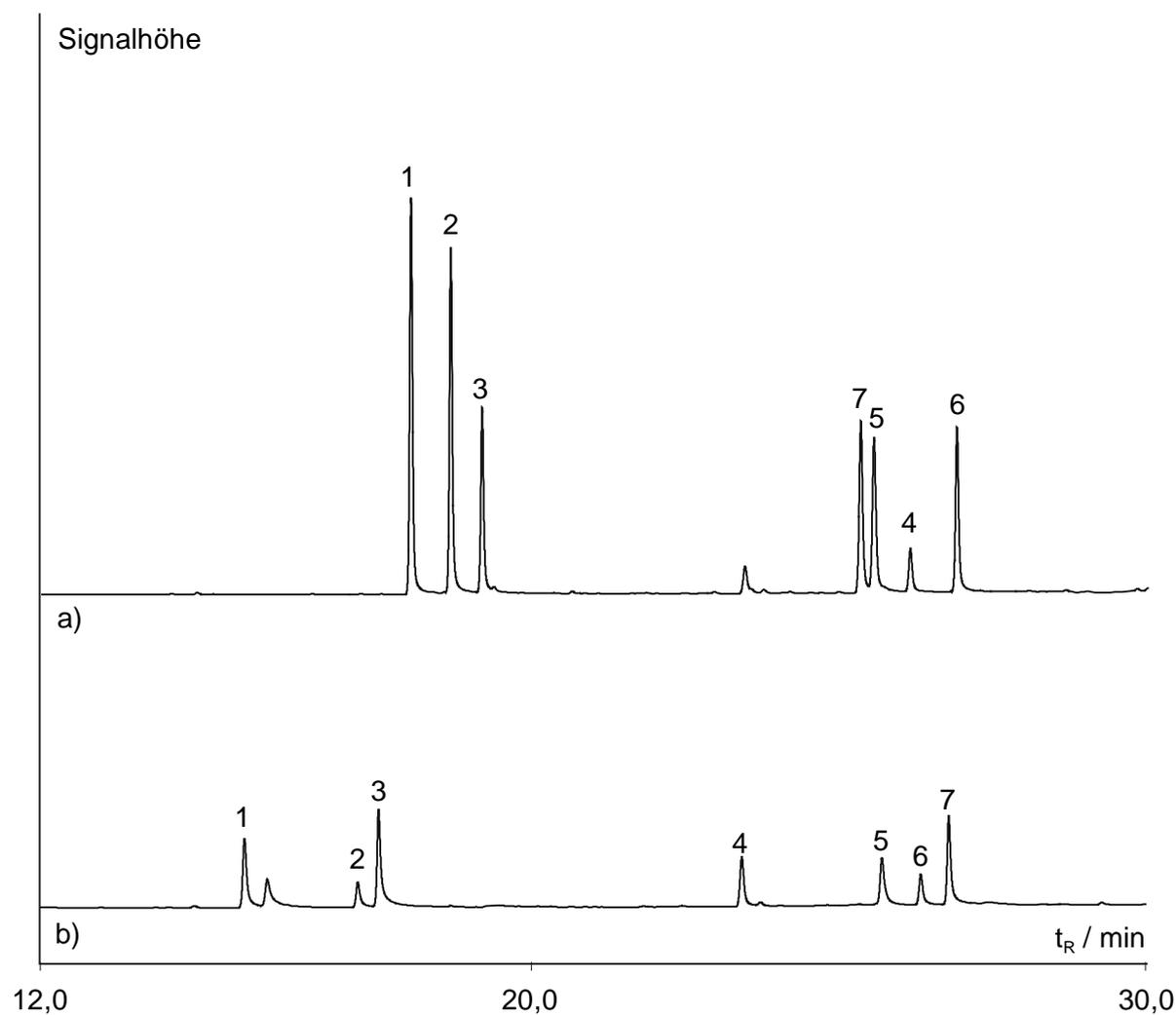


Abb. 30: Chromatogrammvergleich der Aminophenolderivate

a: nach Pentafluorbenzylierung und Iodierung; b: nach Pentafluorbenzylierung;
Peakzuordnung s. Tab. 35, Temperaturprogramm 3

Durch die Iodierung der Pentafluorbenzylether kam es, außer bei den Derivaten des 2-Amino-3-nitrophenols, zu einem deutlichen Anstieg der Peakintensitäten. Nach Umsetzung zu iodierten Derivaten konnten, abgesehen von 2-Amino-3-nitrophenol keine uniodierten Derivate mehr nachgewiesen werden..

Tab. 35: Retentionszeiten und Peak-Nr. der AP-Derivate

Derivat von	Peak-Nr.	t _R / min (iodiert)
2AP	1	18,00
3AP	2	18,65
4AP	3	19,16
2A3NP	4	26,14
4A2NP	5	25,55
2A4NP	6	26,90
2A5NP	7	25,33

11.4 Optimierung der Versuchsbedingungen

11.4.1 Zugabemenge an Iodwasserstoffsäure

Um zu überprüfen, welches Zugabevolumen an Iodwasserstoffsäure für die Derivatisierung der Pentafluorbenzyllderivate ausreichend ist, wurden die Pentafluorbenzylether der Aminophenole unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Iodwasserstoffsäure iodiert. Es wurden

50 µL

100 µL

200 µL

500 µL

Iodwasserstoffsäure eingesetzt. Dabei wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt.

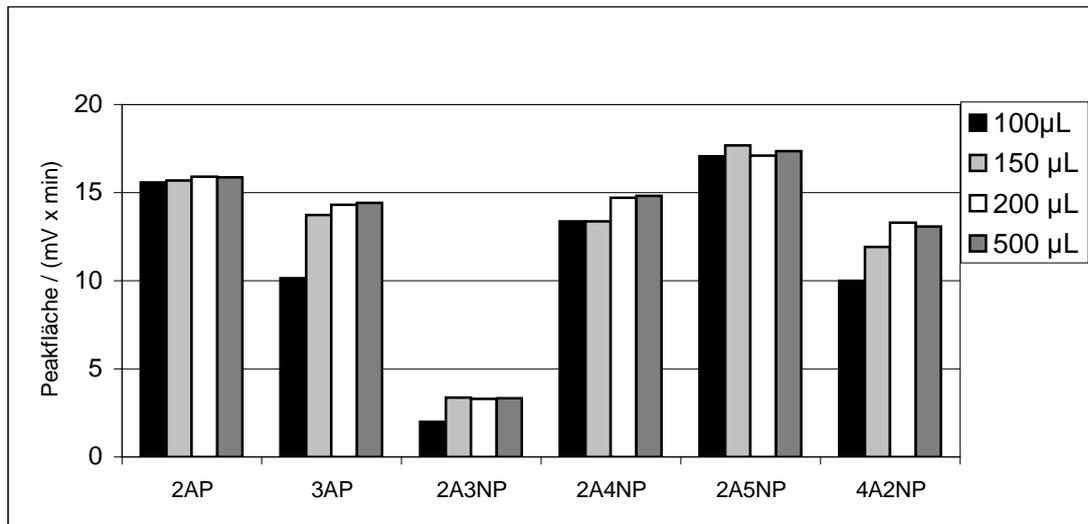


Abb. 31: Abhängigkeit der Peakflächen von der Zugabemenge an HI

Während bei der Steigerung der Zugabemenge von 50 µL auf 100 µL eine teilweise deutliche Vergrößerung der Peakflächen zu beobachten war, fiel dieser Effekt bei weiterer Erhöhung der Iodwasserstoffmenge von 100 µL auf 200 µL deutlich geringer aus. Die Verwendung von 500 µL Iodwasserstoffsäure brachte keine weitere Erhöhung der Derivatisierungsausbeute. Aus diesem Grund wurden im folgenden jeweils 200 µL Iodwasserstoffsäure verwendet.

11.4.2 Extraktion

Des weiteren sollte untersucht werden, ob die einmalige Extraktion mit 1 mL Cyclohexan für eine vollständige Extraktion der Derivate ausreichend ist. Ein Aminobenzoesäuregemisch und ein Aminophenolgemisch wurden derivatisiert und die Reaktionslösungen dreimal mit jeweils 1 mL Cyclohexan extrahiert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Extraktionsraten wurden wie bereits beschrieben berechnet (s. Kap. 9.7). Die Mittelwerte der nach der chromatographischen Trennung erhaltenen Peakflächen, die Extraktionsraten nach einmaliger Extraktion und deren relative Standardabweichungen sind in Tab. 36 aufgeführt. Die Extraktionsraten lagen, außer für das Derivat von 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure für alle Substanzen bei mindestens 95%. Eine einmalige Extraktion mit 1 mL Cyclohexan wurde deshalb als ausreichend gewertet. Die relativen

Standardabweichungen lagen bei dieser Untersuchung zwischen 1,6 % für das Derivat von 2-Aminophenol und 10,8 % für das Derivat von 2-Amino-3-nitrophenol.

Tab. 36: Extraktionsraten der iodierten Pentafluorbenzyllderivate

PFB-I-Derivat von	Peakfläche / (mV · min)			Extraktionsrate (1. Extr.) / %	s _{rel.} / %
	1. Extr.	2. Extr.	3. Extr.		
2ABS	4,28	0,24	n.n.	95	2,9
3ABS	3,24	0,15	n.n.	96	4,3
4ABS	4,63	0,13	n.n.	97	2,5
4A2HBS	1,28	0,09	n.n.	93	6,6
2A4NBS	8,76	0,16	0,02	98	3,5
5A2NBS	7,59	0,15	n.n.	98	4,2
2AP	5,10	0,15	0,01	98	1,6
3AP	7,59	0,14	0,04	98	2,4
4AP	2,91	0,06	n.n.	98	1,8
2A3NP	1,03	0,02	n.n.	98	10,8
2A4NP	4,96	0,06	n.n.	99	4,4
2A5NP	5,99	0,12	n.n.	98	4,0
4A2NP	3,71	0,04	n.n.	99	6,3

s_{rel.}: relative Standardabweichung

n.n.: nicht nachweisbar

11.4.3 Verkürzung der Reaktionszeit nach Amidosulfonsäurezugabe

Um die Analysenzeit abzukürzen, wurde untersucht, ob das 45 minütige Ausschütteln mit Amidosulfonsäure zur Zerstörung überschüssigen Nitrits durch eine Behandlung der Reaktionslösung nach Zugabe der Amidosulfonsäure im Ultraschallbad zu ersetzen ist. Diese Vorgehensweise war bei der Iodierung der basischen aromatischen Amine bereits erfolgreich getestet worden.

Ein Aminophenolgemisch wurde nach Pentafluorbenzylisierung iodiert. Nach Zugabe der Amidosulfonsäure-Lösung wurde die Reaktionslösung 5 min mit Ultraschall behandelt. Zum

Vergleich wurde die Reaktion wie oben beschrieben (s. Kap. 15.3.3) durchgeführt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Behandlung mit Ultraschall führte jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, da die Peakflächen der Derivate von 2-Aminophenol und 4-Aminophenol hier deutlich abnahmen. Eine Verringerung der Analysenzeit war auf diesem Weg deshalb nicht möglich.

11.5 Massenspektrometrische Untersuchung der Derivate

Zur Identifizierung der entstandenen Pentafluorbenzyl-Iod-Derivate wurden Messungen mit GC/MS durchgeführt (Bedingungen, s. Kap 15.1). Die Einzelsubstanzen wurden derivatisiert und mittels GC/MS gemessen. In Abb. 32 ist beispielhaft das Massenspektrum des Derivats von 2-Aminobenzoessäure dargestellt.

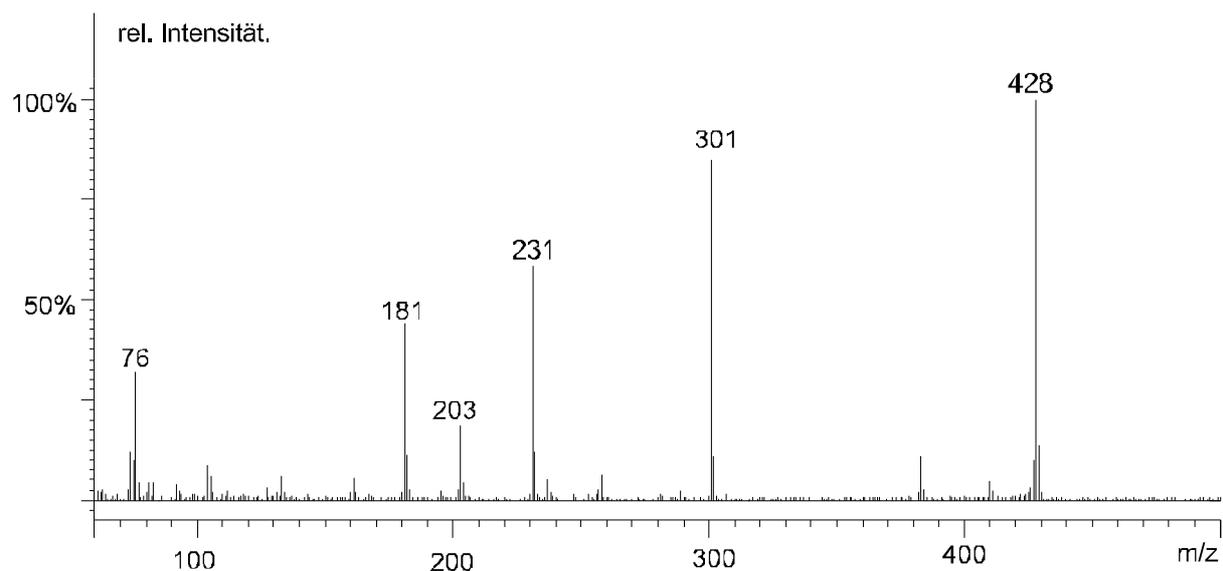


Abb. 32: Massenspektrum des iodierten Pentafluorbenzylderivats von 2ABS

Der M^+ -Peak mit $m/z = 428$ entsprach gleichzeitig auch dem intensivsten Massenfragment. Die Abspaltung von Iod führte zur Bildung des zweitgrößten Massenfragments mit $m/z = 301$.

In Abb. 33 ist das Massenspektrum des Derivats von 3-Aminophenol zu sehen mit einem M^+ -Peak bei $m/z = 400$. Hier stellte der Molekülpeak ebenfalls den Basispeak dar. Das zweitintensivste Massenfragment wurde durch das Pentafluorbenzyl-Kation $m/z = 181$ gebildet.

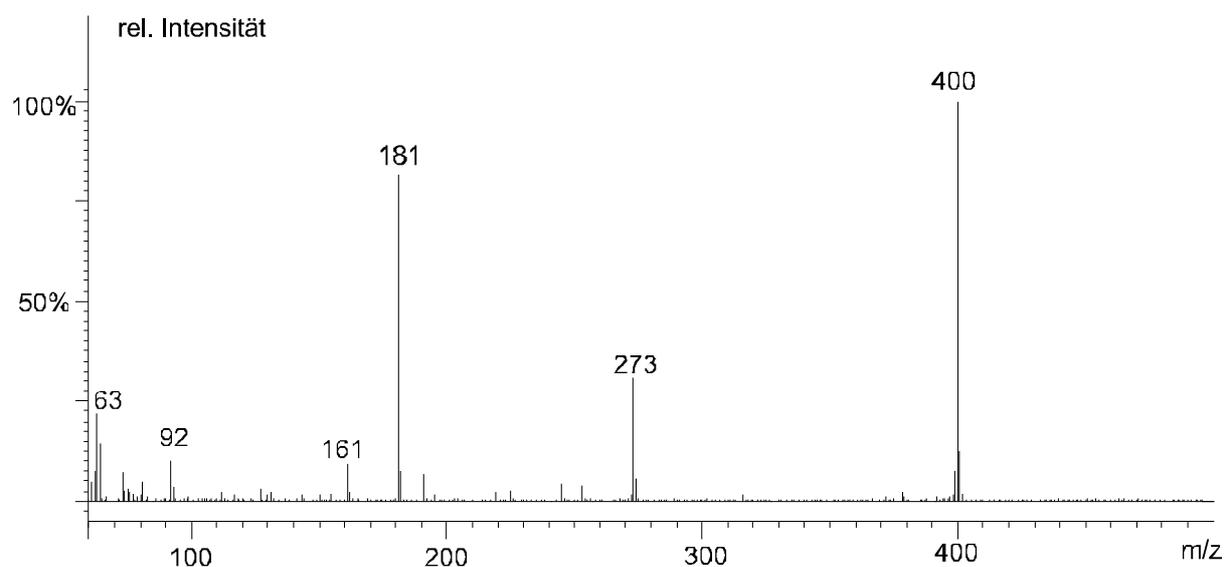


Abb. 33: Massenspektrum des iodierten Pentafluorbenzylderivats von 3AP

In Tab. 37 sind die MS- Daten der iodierten Pentafluorbenzyl-Derivate aufgeführt. Die Molekülmassen der Derivate entsprachen in allen Fällen den für die iodierten Pentafluorbenzyllderivate berechneten Massen. Bei einem Teil der Verbindungen entsprach der M^+ -Peak zugleich dem Basispeak. Bei den Amino-nitrophenolen wurde der Basispeak von dem Pentafluorbenzyl-Kation gebildet. Der Basispeak der Derivate von 3-Aminobenzoesäure und 4-Aminobenzoesäure wurde von dem durch Abspaltung von Iod gebildeten Massenfragment erzeugt. Dieses Fragment spielt, mit Ausnahme des Derivats von 2-Aminobenzoesäure, bei den Derivaten der übrigen Verbindungen kaum eine Rolle.

Tab. 37: MS-Daten der iodierten pentafluorbenzylierten amphoteren aromatischen Amine

Substanz	Derivat	m/z (100 %)	m/z (M ⁺)
2ABS	2-Iodbenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	428	428
3ABS	3-Iodbenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	301	428
4ABS	4-Iodbenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	301	428
4A2HBS	4-Iod-2-hydroxybenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	444	444
2A4NBS	2-Iod-4-nitrobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	362	473
5A2NBS	5-Iod-2-nitrobenzoesäure-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylester	362	473
2AP	2-Iodphenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	181	400
3AP	3-Iodphenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	400	400
4AP	4-Iodphenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	400	400
2A3NP	2-Iod-3-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	181	445
2A4NP	2-Iod-4-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	181	445
2A5NP	2-Iod-5-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	181	445
4A2NP	4-Iod-2-nitrophenyl-2,3,4,5,6-pentafluorbenzylether	181	445

11.6 Kalibrierung und Bestimmungsgrenzen

11.6.1 Aminobenzoensäuren

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde, unter Verwendung von GC-SG S und einer im Verhältnis 1:10 verdünnten Lösung dieses Gemischs, eine Kalibrierung des

Verfahrens durchgeführt. Von 2-Aminobenzoesäure, 3-Aminobenzoesäure und 4-Aminobenzoesäure wurden jeweils 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 3,0 µg und 5,0 µg derivatisiert, von den übrigen Verbindungen jeweils die doppelte Menge an Substanz. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß jeweils 10 Datenpaare zur Berechnung der Kenndaten nach DIN 38402-51 zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind in Tab. 38 aufgeführt.

Tab. 38: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der ABS nach Pentafluorbenzylierung und Iodierung

Derivat von	Ordinatenabschnitt / (mV x min)	Steigung/ (mV x min)	s_x / µg	V_k / %	X_B / ng
2ABS	-0,310	0,757	0,127	5,51	0,413
3ABS	-0,078	0,554	0,101	4,39	0,329
4ABS	0,025	0,523	0,160	6,96	0,522
4A2HBS	-0,153	0,131	0,672	14,61	2,192
2A4NBS	-0,339	0,310	0,294	4,59	0,959
5A2NBS	-0,262	0,425	0,211	6,39	0,688

V_k : Variationskoeffizient

s_x : Verfahrensstandardabweichung

X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 4,39 % für 3-Aminobenzoesäure und 14,61 % für 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 7 %. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 0,33 ng für 3-Aminobenzoesäure und 2,19 ng für 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure, bezogen auf die injizierte Menge an Analyten nach Derivatisierung. Bei einem Großteil der Verbindungen lag X_B bei unter 0,5 ng.

In Abb. 34 ist beispielhaft die Kalibriergerade von 2-Amino-4-nitrobenzoesäure mit oberem und unterem Vertrauensbereich dargestellt. Diese war mit einem Variationskoeffizienten von 4,59 %, wie auch die Kalibriergeraden der übrigen Verbindungen, linear im Sinne der verwendeten DIN.

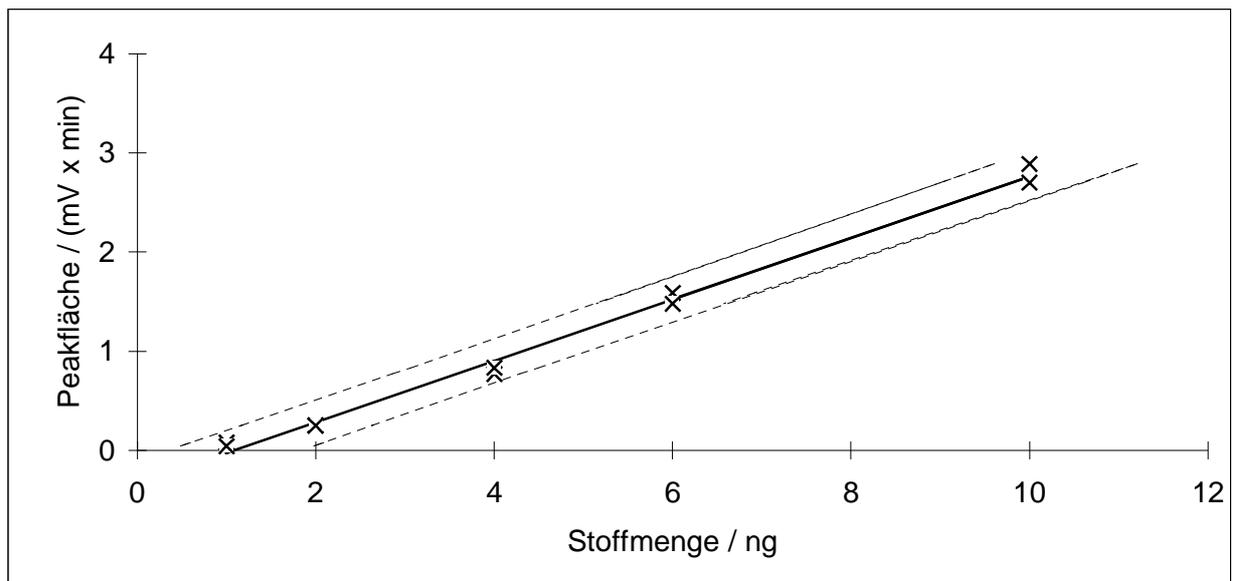


Abb. 34: Kalibriergerade für 2A4NBS nach Pentafluorbenzylierung und Iodierung

11.6.2 Aminophenole

Für die Kalibrierung wurde GC-SG P 1:10 verdünnt, so daß die Konzentrationen der Analyten 0,01 µg/µL bzw. 0,02 µg/µL betragen. Davon wurden

- 50 µL
- 100 µL
- 150 µL
- 200 µL
- 250 µL

derivatisiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß jeweils 10 Datenpaare zur Berechnung der Kenndaten nach DIN 38402-51 zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind in Tab. 39 aufgeführt.

Tab. 39: Kenndaten und Bestimmungsgrenzen der AP nach Pentafluorbenzylisierung und Iodierung

Derivat von	Ordinatenabschnitt / (mV x min)	Steigung / (mV x min)	$s_x / \mu\text{g}$	$V_k / \%$	X_B / ng
2AP	-0,318	2,188	0,038	2,74	0,127
3AP	0,202	1,551	0,079	5,66	0,263
4AP	-0,092	0,768	0,069	4,97	0,231
2A3NP	-0,023	0,226	0,083	5,95	0,276
2A4NP	0,106	1,140	0,058	4,23	0,197
2A5NP	-0,307	2,017	0,068	4,91	0,228
4A2NP	-0,081	1,003	0,073	5,27	0,245

V_k : Variationskoeffizient

s_x : Verfahrensstandardabweichung

X_B : Bestimmungsgrenze

Die Variationskoeffizienten V_k lagen zwischen 2,74 % für 2-Aminophenol und 5,95 % für 2-Amino-3-nitrophenol. Für die meisten Verbindungen lag V_k unter 5 %. Für X_B ergaben sich Werte zwischen 0,13 ng für 2-Aminophenol und 0,28 ng für 2-Amino-3-nitrophenol. Bei allen Verbindungen lag X_B bei unter 0,3 ng.

12 Diskussion

12.1 On-line-SPE/HPLC mit HR-P-Phasen

Das in dieser Arbeit untersuchte HR-P-Sorbens erwies sich als gut geeignet für den Einsatz in der On-line-SPE/HPLC zur Bestimmung der ausgewählten aromatischen Amine in Wasserproben.

Bei der Optimierung der Anreicherungsbedingungen wurde die Mischung aus Acetonitril und Wasser als geeignetes Elutionsmittel festgestellt. Dieses Ergebnis stimmte mit vorhergegangenen Off-line-Untersuchungen überein (22). Auch in der Literatur wurde dieses Elutionsmittel häufig verwendet. Bei der chromatographischen Trennung kam es, im Vergleich zur direkten Injektion, zu einer leichten Peakverbreiterung. Diese war jedoch bei optimalen Bedingungen zu vernachlässigen.

Unter den optimierten Versuchsbedingungen lagen die Wiederfindungsraten sowohl in bidest. Wasser als auch in einer Trinkwassermatrix zwischen 60 % und 103 %, meist bei über 80 %. Hier hatten weder die Probenmatrix noch die Analytkonzentration einen nennenswerten Einfluß auf die Ergebnisse. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,3 % und 5,4 %. Für den Großteil der Verbindungen lagen die Werte bei unter 3 %. Das Verfahren ermöglichte also die Bestimmung der Analyten mit hoher Präzision.

Bei der Bestimmung der Durchbruchvolumina der untersuchten Analyten wurden, mit Ausnahme des sehr polaren 2,6-Diaminotoluols Werte von über 300 mL gefunden. Diese Ergebnisse stimmten mit den Erwartungen überein, da das verwendete Sorbens über eine hohe spezifische Oberfläche verfügt und eine hohe Sorptionskraft für aromatische Verbindungen besitzt.

Die bei der Kalibrierung des Verfahrens erhaltenen Kalibriergeraden wiesen eine hohe Linearität auf, mit Variationskoeffizienten von meist weniger als 2 %. Die bei der Anreicherung von 50 mL Wasserprobe erhaltenen Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 30 ng/L und 80 ng/L, was bereits die Überwachung der bestehenden Grenzwerte ermöglicht. Die Bestimmungsgrenzen könnten durch die Anreicherung größerer Volumina noch erheblich

gesenkt werden. Die Verwendung von Kalibrierlösungen geringerer Konzentrationen für die Ermittlung der Bestimmungsgrenzen hätte zudem bei deren Berechnung nach DIN 38402-51 für eine weitere Absenkung der berechneten Werte für X_B geführt.

Die Obergrenze des linearen Arbeitsbereichs ließ sich, wiederum mit Ausnahme des 2,6-Diaminotoluols, auf mindestens 40 $\mu\text{g/L}$ ausweiten. Aufgrund der bereits sehr großen Analyt-Peaks wurde eine weitere Erhöhung der Konzentrationen nicht untersucht. Für das Arbeiten in größeren Konzentrationsbereichen wäre eine Verdünnung der Wasserproben als vorteilhafter anzusehen.

Das hier untersuchte Verfahren kann problemlos zur Überprüfung der Grenzwerte für aromatische Amine in Trinkwasser eingesetzt werden. Dabei spielt es keine Rolle, daß nicht für alle Substanzen Wiederfindungsraten von 100 % gefunden wurden, da die Kalibrierung über das gesamte Verfahren durchgeführt wurde. Da in dieser Arbeit unterschiedlich substituierte Aniline mit unterschiedlich hoher Polarität untersucht wurden, dürfte die Übertragung des Verfahrens auf weitere aromatische Amine wenig Schwierigkeiten bereiten. Die Hauptaufgabe läge dabei in der Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Gradientenprogramms. Aufgrund der recht hohen Anfangskonzentration von Acetonitril (28 %) könnte dies für die Trennung von polaren Isomeren zu Problemen führen.

Die Haltbarkeit der Vorsäulen wurde nicht explizit bestimmt. Die Vorsäulen konnten für mindestens 50 Anreicherungen von Wasserproben in den hier untersuchten Matrices ohne signifikante Verschlechterung der Wiederfindungsraten verwendet werden. Um einer möglichen Verstopfung der SPE-Säule vorzubeugen, wurde diese nach ca. 10 Anreicherungsversuchen gewendet.

12.2 Vergleich mit anderen Verfahren

In Tab. 40 sind die Wiederfindungsraten in bidest. Wasser nach On-line-SPE mit HR-P- und PRP-1-Phasen sowie die Wiederfindungsraten nach Off-line-SPE aufgeführt. Hierbei ist keine Aussage zu treffen, welches Verfahren für die Bestimmung der Aniline besser geeignet ist. Die Wiederfindungsraten lagen bei den On-line-Verfahren für die meisten Analyten dicht beieinander. Eine Ausnahme war 2,6-Diaminotoluol. Dessen Wiederfindungsrate war bei Verwendung der PRP-1-Vorsäulen nur halb so groß, was auf die erheblich kleineren

Durchbruchsvolumina für stark polare Substanzen bei dem PRP-1-Material zurückzuführen ist.

Tab. 40: Vergleich der Wiederfindungsraten in bidest. Wasser

Substanz	HR-P (on-line)	S _{rel.}	PRP-1 (on-line)	S _{rel.}	HR-P (off-line)	S _{rel.}
	WDF / % ^a	/ %	WDF / % ^a	/ %	WDF / % ^b	/ %
2,6DAT	60	1,65	32	8,79	57	4,56
2,4DA6NT	99	2,02	84	1,98	94	5,76
4NA	93	5,20	98	8,63	99	7,54
4AT	99	4,08	98	5,69	84	6,74
4CIA	100	2,19	96	2,36	92	5,67
2A4NT	101	1,63	97	1,29	99	5,63
3,5DNA	93	0,84	92	1,52	98	4,91
2NphA	84	5,17	84	1,96	89	7,64
2A4,6DNT	87	0,31	85	1,36	102	5,27
3,4DCIA	87	0,26	89	2,36	99	5,49
4ABPh	75	0,96	86	2,98	88	4,99
2,4,5TCIA	68	0,68	66	5,36	96	5,97

WDF: Wiederfindungsrate

a: Anreicherungsvolumen: 50 mL, c = 0,5 µg/L, je Analyt

b: Anreicherungsvolumen: 500 mL, c = 20 µg/L, je Analyt

S_{rel.}: relative Standardabweichung

Der Vergleich mit den Wiederfindungsraten bei Off-line SPE zeigte, daß off-line teilweise etwas höhere Wiederfindungsraten gefunden wurden. Der Nachteil bei diesem Verfahren lag in der schlechteren Reproduzierbarkeit. Dies wurde beim Vergleich der relativen Standardabweichungen deutlich. Diese lagen bei dem Off-line-Verfahren meist deutlich höher. Die berechneten Bestimmungsgrenzen lagen für das Off-line Verfahren weit höher als bei der On-line-Bestimmung, da die Analyten durch das Elutionsvolumen von 3 mL stark verdünnt wurden und nur ein Aliquot zur Analyse verwendet wurde. Das Einengen der Eluate vor der Analyse hätte zwar zu einer Verringerung der Bestimmungsgrenzen geführt, die Präzision hätte sich hierbei aber vermutlich noch erheblich verschlechtert.

Durch alleinige Betrachtung der Wiederfindungsraten und der relativen Standardabweichungen konnte nicht festgestellt werden, welches der beiden Sorbentien für die On-line-Anreicherung aromatischer Amine besser geeignet war. Die Erhöhung des Anreicherungsvolumens zeigte jedoch, daß die Durchbruchsvolumina der Analyten bei den HR-P-Phasen vor allem für früh eluierte Verbindungen deutlich größer waren. Die HR-P-Festphasen ermöglichten also die Anreicherung größerer Probenvolumina. Ein Nachteil dieses Sorbens war die im Vergleich zum PRP-1-Material etwas schlechtere Peakform, die auf die höhere Sorptionskraft des HR-P-Materials zurückzuführen ist, was die Bestimmung aber nicht störte.

12.3 Pentafluorbenzylierung amphoterer aromatischer Amine

Die Optimierung der hier untersuchten Derivatisierung amphoterer aromatischer Amine zeigte, daß die Verwendung von Aceton als Lösungsmittel im Vergleich zu den übrigen untersuchten Lösungsmitteln die besten Ergebnisse lieferte. Als geeignete Base wurde Kaliumcarbonat ermittelt. Weiterhin erhöhte die Zugabe von 18-Krone-6 die Reaktionsausbeute. Die entstandenen Derivate ließen sich mittels GC/ECD unter den gewählten chromatographischen Bedingungen innerhalb von 25 min trennen, zeigten aber durch die verbliebenen Amino-Gruppen verursachtes Peak tailing. Eventuell bei der Reaktion entstandene Nebenprodukte störten die Trennung bzw. Bestimmung nicht.

Unter optimierten Bedingungen wurden die Bestimmungsgrenzen ermittelt. Diese lagen für Aminobenzoesäuren zwischen 0,3 ng und 5,8 ng und für Aminophenole zwischen 0,15 ng und 0,26 ng, bezogen auf die injizierte Analytmenge. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 1,2 und 4,5 % für die Aminobenzoesäure-Derivate und zwischen 1,4 und 4,8 % für die Aminophenol-Derivate.

Die Derivate wurden mittels GC/MS untersucht. In den Massenspektren traten neben den Molekül-Peaks charakteristische Massenfragmente auf, die entweder durch Abspaltung eines Pentafluorbenzylradikals oder durch das Pentafluorbenzyl-Kation selbst gebildet wurden. Die Bildung charakteristischer Fragmente würde die Identifizierung unbekannter Aminobenzoesäuren oder -phenole in komplexen Proben erleichtern.

Da die Anwesenheit von Wasser die Reaktion störte, wird das Verfahren nicht ohne größere Schwierigkeiten auf die Untersuchung von Wasserproben angewandt werden können, da bei den bisher untersuchten Verfahren zur SPE amphoterer Verbindungen Elutionsmittel verwendet wurden, die über einen nicht unerheblichen Wasseranteil verfügten (21). Die Extraktion von Bodenproben, anschließender Lösungsmittelwechsel gefolgt von Pentafluorbenzylierung wäre hier eher denkbar.

12.4 Iodierung der Pentafluorbenzyllderivate

Die Umsetzung der Pentafluorbenzyllderivate zu den iodierten Derivaten verlief erfolgreich. Die Derivate konnten gaschromatographisch getrennt werden, und es konnten mit einer Ausnahme keine uniodierten Pentafluorbenzyllderivate mehr nachgewiesen werden. Die Peakform wurde im Vergleich zu den Chromatogrammen der uniodierten Derivate wie zu erwarten verbessert.

Unter optimierten Bedingungen wurden die Bestimmungsgrenzen ermittelt. Diese lagen für Aminobenzoesäuren zwischen 0,33 ng und 2,19 ng und für Aminophenole zwischen 0,13 ng und 0,26 ng, bezogen auf die injizierte Analytmenge. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 1,2 % und 4,5 % für die Aminobenzoesäure-Derivate und zwischen 1,6 % und 10,8 % für die Aminophenol-Derivate. Der Vergleich der Bestimmungsgrenzen mit den für die uniodierten Derivate berechneten zeigte keine signifikante Verbesserung. Dies lag jedoch am verwendeten DIN-Verfahren, bei dem die Bestimmungsgrenzen aus der Verfahrensstandardabweichung berechnet werden. Der Chromatogrammvergleich zeigte jedoch, daß zumindest bei den Aminophenolen die Empfindlichkeit des Detektors auf die Derivate nach der Iodierung deutlich gesteigert wurde.

Da die Abspaltung von einem oder mehreren Iodatomen ($\Delta m = 127$) in den Massenspektren der iodierten Derivate der basischen Aniline gut zu sehen war (22), lieferten diese Spektren Informationen über die Anzahl der Iodatome im Molekül und somit über die Anzahl der Aminogruppen vor der Iodierung. Die Abspaltung von Iod war bei den amphoteren aromatischen Aminen nur bei wenigen Verbindungen zu beobachten. Bei allen Derivaten trat das Pentafluorbenzylkation ($m/z = 181$) in den Massenspektren auf. Anhand der Massenspektren konnte davon ausgegangen werden, daß sich tatsächlich die erwarteten Derivate gebildet hatten.

Die Substitution der Aminogruppen durch Iod zeigte auch, daß die vorhergehende Pentafluorbenzylierung der Analyten tatsächlich an den sauren Gruppen der Verbindungen und nicht etwa an den Aminogruppen stattgefunden hatte. Die Massenspektren der Pentafluorbenzylderivate ließen diese eindeutige Aussage nicht zu.

13 Zusammenfassung

Durch ihren vielfältigen Einsatz bei industriellen Prozessen kommt es zum Eintrag aromatischer Amine in die Umwelt. Neben der industriellen Emission ist der mikrobielle Abbau anderer Substanzen, wie Pflanzenschutzmittel oder Nitroaromaten, eine weitere Quelle für Verunreinigungen durch Aniline. Da viele dieser Verbindungen ein toxisches oder carcinogenes Potential besitzen, wurden verschiedene Grenzwerte für diese Substanzen festgelegt, die zwischen 0,1 und 1,0 µg/L in Trinkwasser liegen. Zur Überwachung dieser Grenzwerte sind empfindliche Verfahren zum Einzelnachweis der aromatischen Amine unerlässlich. Diese Verfahren sollten nach Möglichkeit auch im Routinebetrieb einsetzbar sein. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung leicht durchzuführender empfindlicher Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine.

Es wurde ein On-line-Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine mittels HPLC mit vorangegangener Festphasenextraktion untersucht. Bei dem verwendeten Festphasen-Material handelte es sich um ein hochgradig vernetztes PS-DVB-Kopolymer. Nach Einstellen der Wasserproben auf pH 10,5 und unter Verwendung eines Acetonitril/Wasser-Gemisches als Eluent wurden bei Anreicherung von 50 mL Wasserprobe Bestimmungsgrenzen von weniger als 80 ng/L ermittelt. Aufgrund der hohen Durchbruchsvolumina der meisten Analyten wäre eine Absenkung der Bestimmungsgrenzen durch Erhöhung des Anreicherungs volumens möglich. Die Präzision der Bestimmungen war hoch; die relativen Standardabweichungen lagen meist bei unter 2 %. Die Wiederfindungsraten der meisten Verbindungen lag bei über 80 %, unabhängig davon, ob die Bestimmung in bidest. Wasser oder in einer Trinkwassermatrix erfolgte.

Für die Bestimmung amphoterer aromatischer Amine mittels GC/ECD wurde ein Derivatisierungsverfahren entwickelt. Die Umsetzung mit Pentafluorbenzylbromid lieferte für alle untersuchten Aminobenzoesäuren und Aminophenole die erwarteten Derivate, die sich gaschromatographisch trennen und bestimmen ließen. Möglicherweise entstandene Nebenprodukte störten die Bestimmung nicht. Die Bestimmungsgrenzen lagen bei optimierten Bedingungen zwischen 0,15 und 5,8 ng.

Durch die weitere Umsetzung der Pentafluorbenzyllderivate mit Iod in einer SANDMEYER-ähnlichen Reaktion wurde eine Verbesserung der Peakformen und eine leichte Absenkung der Bestimmungsgrenzen erreicht.

14 Literaturverzeichnis

1. C. Gandini, C. Caccialanza, M. Kitsos, G. Massolini, E. de Lorenzi
Determination of 5-aminosalicylic acid and related compounds in raw materials and pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. **540** (1991) 416-421
2. V. Andrisano, R. Gotti, A.M. di Pietra, V. Cavrini
Analysis of Basic Hair Dyes by HPLC with On-line Post-column Photochemical Derivatization
Chromatographia **39** (1994) 138-145
3. K.H. Domsch
Pestizide im Boden
VCH, Weinheim, 1992
4. P. Vitali, E. Venturini, C. Bonora, R. Calori, R. Raffaelli
Determination of triazines and dinitroanilines in waters by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction
J. Chromatogr. A **660** (1994) 219-222
5. Th. Kahl, K.-W. Schröder, F.R. Lawrence, W. Marshall, H. Höke, R. Jäckh
Aniline - Derivatives
in:
Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. Auflage, Electronic Release
VCH, Weinheim, 2001
6. A. de Kok, Y.J. Vos, C. van Garderen, T. de Jong, M. van Opstal, R.W. Frei, R.B. Geerdink, U.A.Th. Brinkmann
Chromatographic determination of phenylurea herbicides and their corresponding aniline degradation products in environmental samples
J. Chromatogr. **288** (1984) 71-90
7. E.A. Clarke, R. Anliker
Organic Dyes and Pigments
in:
O. Hutzinger (Hrsg.)
Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3A, S. 181-215
Springer, Heidelberg, 1980
8. R.A. Larson, E.J. Weber
Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry
Lewis, Boca Raton, 1994
9. A. Pielesz
The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis
J. Molecul. Struct. **511-512** (1999) 337-344

10. W. Neumeier, R. Haas, E. von Löw
Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Sprengstoffproduktion
Teil 1: Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol
Forum Städtehygiene **40** (1989) 32-37
11. E. von Löw, L. Kaminski, W. Neumeier, R. Haas, K. Steinbach
Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Sprengstoffproduktion
Teil 2: Migration und mikrobielle Metabolisierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) im
Grundwasser
Forum Städtehygiene **40** (1989) 347-349
12. J. Spain (Hrsg.)
Biodegradation of Nitroaromatic Compounds
Plenum Press, New York, 1995
13. A. Preiß, K. Levsen, E. Humpfer, M. Spraul
Application of high-field proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy for
the analysis of explosives and related compounds in groundwater samples - a comparison
with the high-performance liquid chromatographic (HPLC) method
Fresenius' J. Anal. Chem. **356** (1996) 445-451
14. K. Levsen, P. Mußmann, E. Berger-Preiß, A. Preiß, D. Volmer, G. Wünsch
Analysis of Nitroaromatics and Nitramines in Ammunition Waste Water and in Aqueous
Samples from Former Ammunition Plants and Other Military Sites
Acta. hydrochim. hydrobiol. **21** (1993) 153-166
15. T. C. Schmidt, M. Leß, R. Haas, E. von Löw, K. Steinbach
Determination of aromatic amines in ground and waste water by two new derivatization
methods
Intern. J. Environ. Anal. Chem. **74** (1999) 25-41
16. L. Fishbein
Analysis of Carcinogenic and Mutagenic Aromatic Amines: An Overview
Toxicol. Environ. Chem. Rev. **3** (1980) 145-168
17. M.-C. Hennion, P. Subra, V. Coquart, R. Rosset
Determination of polar aniline derivatives in aqueous environmental samples using on-
line liquid chromatographic preconcentration techniques
Fresenius' J. Anal. Chem. **339** (1991) 488-493
18. Trinkwasserverordnung vom 05.12.1990
BGBl. I (1990), 2612-2629
19. W. Spyra, K. Lohs, M. Preussner, H. Rüden, K.J. Thome-Kozmiensky
Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten
EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 1992

20. E. Reitermeier
Identifizierung und Bestimmung von aromatischen Aminen in Wasserproben aus dem Bereich einer Rüstungsalast mit Hilfe der HPLC
Dissertation, Marburg, 1991
21. C. Boehme
Festphasenextraktion amphoterer Aminoaromaten mit graphitiertem Kohlenstoff
Diplomarbeit, Marburg, 1997
22. T.C. Schmidt
Aromatische Amine in Wasser
Dissertation, Marburg, 1997
23. G. Rippen
Handbuch Umweltchemikalien (Loseblattsammlung)
Stand der 11. Ergänzungslieferung 8/1991
ecomed, Landsberg, 1990
24. G. Boer, C. Schlett, H.-P. Thier
Substituierte Aniline - Gaschromatographische Bestimmung und Verhalten bei einer simulierten Bodenpassage
Vom Wasser **80** (1993) 59-63
25. E.J. Weber, D.L. Spidle, K.A. Thorn
Covalent Binding of Aniline to Humic Substances. 1. Kinetic Studies
Environm. Sci. Technol. **30** (1996) 2755-2763
26. O.P. Homenauth. M.B. Mc Bride
Adsorption of Aniline on Layer Silicate Clays and Organic Soil
Soil Sci. Soc. Am. J. **58** (1994) 347-354
27. A.V. Willi, W. Meier
Die Hammett'schen σ -Werte der Gruppen $-\text{NH}_2$ und $-\text{NH}_3^+$. Zwitterionen-Bildungsgleichgewichte in Lösungen aromatischer Aminosäuren
Helv. Chim. Acta **33** (1956) 318-322
28. G. Grimmer, G. Dettbarn, A. Seidel, J. Jacob
Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers
Sci. Total Environ. **247** (2000) 81-90
29. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.)
MAK- und BAT-Werte-Liste 1996
VCH, Weinheim, 1996
30. S.M. Sicardi, J.L. Martarena. M.T. Iglesias
Mutagenic and Analgetic Activities of Aniline Derivatives
J. Pharmaceut. Sci. **80** (1991) 761-764

31. K.T. Chung, L. Kirkovsky, A. Kirkovsky, W.P. Purcell
Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines:
quantitative structure-activity relationships
Mutat. Res. **387** (1997) 1-16
32. R. Yoshida
Mutagenicity of p-Aminophenol in *E. coli* WP2uvrAIKM101 and its Relevance to
Oxidative DNA Damage
Mutat. Res. **415** (1998) 139-150
33. W. Hou, E. Wang
Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with a parallel dual-
electrode electrochemical detector
Talanta **37** (1990) 841-844
34. R.C.C. Wegmann, G.A.L. de Korte
The Gas-Chromatographic Determination of Aromatic Amines after Bromination in
Surface Waters
Intern. J. Environ. Anal. Chem. **9** (1981) 1-6
35. H. Börnick, V. Hultsch, T. Grischek, D. Lienig, E. Worch
Aromatische Amine in der Elbe-Analytik und Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung
Vom Wasser **87** (1996) 305-326
36. S. Paul, D. Lienig, E. Worch
Anwendung der Mikrofestphasenextraktion zur Anreicherung ausgewählter aromatischer
Amine aus Oberflächenwasser
Vom Wasser **88** (1997) 273-283
37. B. Scholz, N. Palauschek
The determination of substituted aromatic amines in water and sediment samples
Fresenius Z. Anal. Chem. **331** (1988) 282-289
38. D. Bethmann, F. Sacher, H.-J. Brauch
SPON (Solid Phase extractable Organic Nitrogen) – Ein Gruppenparameter zur
Bestimmung von aromatischen Stickstoffverbindungen in Wasser
Vom Wasser **87** (1996) 171-185
39. D. Meinzer
Aromatische Amine im Grundwasser einer Gaswerksaltlast. Identifizierung, Bestimmung
und Bedeutung.
Dissertation, Marburg, 2000
40. M. Petersmann
Untersuchung von Wasserproben aus dem Bereich einer Rüstungsalzlast auf polare
aromatische Amine mit Hilfe der HPLC nach Extraktion an Festphasen
Dissertation, Marburg, 1995
41. L. Wennrich, U. Lewin, J. Efer, W. Engewald
Analytik von Diamino- und Aminonitroaromaten in Wasser mittels Festphasenextraktion
Vom Wasser **86** (1996) 341-352

42. P. Mußmann, R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch
Determination of Nitrophenols, Diaminotoluenes and Chloroaromatics in Ammunition Waste Water
Acta hydrochim. hydrobiol. **23** (1995) 13-19
43. G. Skarping, L. Renman, B.E.F. Smith
Trace analysis of amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection
I. Determination of aromatic amines as perfluoro fatty acid amides using electron capture-detection
J. Chromatogr. **267** (1983) 315-327
44. B. Gawdzik, T. Matynia
Use of porous polymers in off-line preconcentration of nitrobenzenes and their reduction products from water
J. Chromatogr. A **733** (1996) 491-496
45. A. di Corcia, R. Samperini
Determination of Chloroaniline Traces in Environmental Waters by Selective Extraction with Two Traps in Tandem and Liquid Chromatography
Anal. Chem. **62** (1990) 1490-1494
46. M.W.F. Nielen, R.W. Frei, U.A.Th Brinkmann
Use of cation exchangers for the on-line preconcentration of polar anilines in liquid chromatography
J. Chromatogr. **317** (1984) 557-567
47. T. Reemtsma
Methods of analysis of polar aromatic sulfonates from aquatic environments
J. Chromatogr. A **733** (1996) 473-489
48. H.H. Dieter
Summenbewertung von nitro(amino)aromatischen Verbindungen
Dokumentation des 1. Elsteraner Fachgesprächs vom 3. / 4. Juni 1993
WaBoLu-Hefte Nr. 8 (1994)
49. V. Andrisano, R. Gotti, A.M. di Pietra, V. Cavrini
HPLC Analysis of oxidation hair dyes in permanent hair colorants
J. Liq. Chromatogr. **17** (1994) 2919-2937
50. K. Spiegel, T. Welsch
Monitoring degradation process of explosives by HPLC analysis with UV- and amperometric detection
Fresenius' J. Anal. Chem. **357** (1997) 333-337
51. E. Marengo, M.C. Gennaro, V. Gianotti, E. Prenesti
Optimization of the separation of mono- and dichloroanilines in ion interaction high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. A **863** (1999) 1-11

52. Y.-C. Wu, S.-D. Huang
Cloud point preconcentration and liquid chromatographic determination of aromatic amines in dyestuffs
Anal. Chim. Acta **373** (1998) 197-206
53. D. Meinzer
Einsatzmöglichkeiten eines elektrochemischen Detektors in der Analytik von Sprengstoffen und Metaboliten
Diplomarbeit, Marburg, 1995
54. U. Lewin, J. Efer, W. Engewald
High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection for residues of explosives in water samples around a former ammunition plant
J. Chromatogr. A **730** (1996) 161-167
55. R.B. Geerdink
Determination of aniline derivatives by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection
J. Chromatogr. **445** (1988) 273-281
56. O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano
Determination of aromatic sulphonates in surface waters by high-performance liquid chromatography with coupled fluorescence and UV detection
J. Chromatogr. A **671** (1994) 217-223
57. P.M. Gates, E.T. Furlong, T.F. Dorsey, M.R. Burkhardt
Determination of nitroaromatic explosives and their degradation products in unsaturated-zone water samples by high-performance liquid chromatography with photodiode-array, mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection
Trends Anal. Chem. **15** (1996) 319-325
58. H. Kataoka
Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis
J. Chromatogr. A **733** (1996) 19-34
59. K. Schoene, H.-J. Bruckert, J. Steinhanses, A. König
Two stage derivatization with N-(tert-butyl dimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA) and N-methyl-bis-(trifluoroacetamid) (MBTFA) for the gas chromatographic analysis of OH-, SH- and NH-compounds
Fresenius' J. Anal. Chem. **348** (1994) 364-370
60. T.C. Schmidt, R. Haas, E. von Löw
Derivatization of aromatic amines for analysis in ammunition waste water
I: Derivatization via bromination of the aromatic ring
Fresenius' J. Anal. Chem. **357** (1997) 909-914
61. J. Tekel, K. Schultzová, J. Kovaciocová, E. Brandsterová
Capillary GS with Nitrogen-Selective Detection for On-Line Analysis of Substituted Anilines Formed from Phenylurea Herbicides
J. High Resol. Chromatogr. **16** (1993) 126-128

62. M.C. Garrigós, F. Reche, K. Pernías, A. Sánchez, A. Jimenéz
Determination of some aromatic amines in finger-paints for children's use by supercritical fluid extraction combined with gas chromatography
J. Chromatogr. A **819** (1998) 259-266
63. A. Cavallaro, V. Piangerelli, F.K Nerini, S. Savalli, C. Reschiotto
Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction
J. Chromatogr. A **709** (1995) 361-366
64. A. Dworschak
Einsatzmöglichkeiten der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie
Dissertation, Marburg, 2000
65. anonym
Identification and determination of 22 carcinogenic amines of the MAK Value List III A1/A2 as degradation products of textile azo dyes
Application note A-64.4
CAMAG, Muttenz; 3/1996
66. J. Franc, V. Koudelková
Thin-layer chromatography of aromatic amines and their derivatives after reaction with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene
J. Chromatogr. **170** (1979) 89-97
67. R. Haas, I. Schreiber, M. Losekam, G. Koss
Trennung, Nachweis und Bestimmung von Benzidin, α - und β -Naphthylamin
Fresenius Z. Anal. Chem. **335** (1989) 980-981
68. R. Haas
Trennung, Nachweis und Bestimmung von Nitrotoluidinen
Forum Städte-Hygiene **36** (1985) 86-89
69. M.-C. Hennion
Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography
J. Chromatogr. A **856** (1999) 3-54
70. I. Liška
Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview
J. Chromatogr. A **885** (2000) 3-16
71. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull
New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water
Trends Anal. Chem. **17** (6) (1998) 384-394

72. J. Scheurer
Solid-Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues - A Review
J. Anal. Tox. **16** (1992) 264-269
73. T.S. Oostdyck, R.L.Grob, J.L. Snyder, M.E. McNally
Solid-Phase Extraction of Primary Aromatic Amines from Aqueous Samples; Comparison with Liquid-Liquid Extraction Techniques
J. Environ. Sci. Health A **29** (1994) 1607-1628
74. I. Ferrer, D. Barceló
Stability of pesticides stored on polymeric solid-phase extraction cartridges
J. Chromatogr. A **778** (1997) 161-170
75. I. Liška, J. Krupčík, P.A. Lequercq
The Use of Solid Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrices- A Review of Solid-Phase Extraction Techniques
J. High Resol. Chromatogr. **12** (1989) 577-590
76. D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martinez, J.S. Salau
Solid-phase sample preparation and stability of pesticides in water using Empore disks
Trends Anal. Chem. **13** (1994) 352-360
77. M.T. Galceran, O. Jáuregui
Determination of phenols in sea water by liquid chromatography with electrochemical detection after enrichment by using solid-phase extraction cartridges and disks
Anal. Chim. Acta **304** (1995) 75-84
78. E. Chladek, R.S. Marano
Use of Bonded Phase Silica Sorbents for the Sampling of Priority Pollutants in Wastewaters
J. Chromatogr. Sci. **22** (1984) 313
79. N.W.F. Nielen, U.A.Th. Brinkmann, R.W. Frei
Industrial Wastewater Analysis by Liquid Chromatography with Precolumn Technology and Diode-Array Detection
Anal. Chem. **57** (1985) 806-810
80. M.R. Buchmeiser, N. Atzl, G.K. Bonn
Ring-Opening-Metathesis Polymerization für the Preparation of Carboxylic-Acid-Functionalized, High-Capacity Polymers for the Use in Separation Techniques
J. Am. Chem. Soc. **119** (1997) 9166-9174
81. C. Crescenzi, A. di Corcia, G. Passariello, R. Samperi, M.I. Turnes Carou
Evaluation of two new examples of graphitized carbon blacks for use in solid-phase extraction cartridges
J. Chromatogr. A **733** (1996) 41-55

82. A. di Corcia, S. Marchese, R. Samperi
Evaluation of graphitized carbon black as a selective adsorbent for extracting acidic organic compounds from water
J. Chromatogr. **642** (1993) 163
83. D. Puig, D. Barceló
Comparison of different sorbent materials for on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatographic determination of priority phenolic compounds in environmental waters
J. Chromatogr. A **733** (1996) 371-381
84. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull
Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography
J. Chromatogr. A **793** (1998) 257-263
85. E.S.P. Bouvier, D.M. Martin, P.C. Iranetta, M. Caparella, Y.-F. Cheng, D.J. Phillips
A Novel Polymeric Reversed-Phase Sorbent for Solid-Phase Extraction
LC•GC **15** (1997) 152-156
86. M. Åkerblom
Chemistry of Plant Protection: Analysis of Pesticides in Ground and Surface Water
Springer-Verlag, Vol. 1, Berlin, 1995
87. E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel
On-Line Preconcentration and Gas-Chromatographic Determination of N-Methylcarbamates and Their Degradation Products in Aqueous Samples
Environ. Sci. Technol. **30** (1996) 2071-2077
88. J.S. Fritz, P.J. Dumont, L.W. Schmidt
Methods and materials for solid-phase extraction
J. Chromatogr. A **691** (1995) 133-140
89. N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull
Solid-phase Extraction of Phenols and Pesticides in Water With a Modified Polymeric Resin
Analyst **122** (1997) 425-428
90. N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull
Chemically modified polymeric resin used as sorbent in a solid-phase extraction process to determine phenolic compounds in water
J. Chromatogr. **771** (1997) 55-61
91. N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull
Determination of Eleven Priority EPA Phenolics at ng L^{-1} Levels by On-Line Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV and Electrochemical Detection
Chromatographia **47** (1998) 176-182

92. M. Less, T.C. Schmidt, E. von Löw, G. Stork
Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine
II: Enrichment
J. Chromatogr. A **810** (1998) 173-182
93. V. Pichon, L. Chen, N. Durand, F. Le Goffic, M.-C. Hennion
Selektive trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides
J. Chromatogr. A **725** (1) (1996) 107-119
94. V. Pichon, H. Rogniaux, N. Fischer Durand, S. Ben Rejeb, F. Le Goffic, M.-C. Hennion
Characteristics of Immunosorbents Used as a New Approach to Selective Solid-Phase Extraction in Environmental Analysis
Chromatographia **45** (1997) 289
95. A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Cámara
Immunosorbents: A new tool for pestizide sample handling in environmental analysis
Fresenius' J Anal. Chem. **357** (1997) 927-933
96. T. Takeuchi, J. Haginaka
Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers
J. Chromatogr. B **728** (1999) 1-20
97. E.R. Brouwer, D.J. Van Iperen, I. Liska, H. Lingemann, U.A.Th. Brinkmann
Liquid Chromatographic Determination of Polar Pollutants in Surface Water Using Membrane Extraction Disks for On-line Trace Enrichment
Int. J. Environ. Anal. Chem. **47** (1992) 257-266
98. X. Guo, S. Mitra
On-line membrane extraction liquid chromatography for monitoring semi-volatile organics in aqueous matrices
J. Chromatogr. A **904** (2000) 189-196
99. V. Pichon, M.-C. Hennion
Determination of pesticides in environmental waters by automated on-line trace enrichment and liquid chromatography
J. Chromatogr. A **665** (1994) 269
100. J. Slobodník, Ö. Öztekizan, H. Lingemann, U.A.Th. Brinkmann
Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns
J. Chromatogr. A **750** (1996) 227-238
101. E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull
Improvement of On-Line Solid-Phase Extraction for Determining Phenolic Compounds in Water
Chromatographia **41** (1995) 521-526

102. E. Mallat, D. Barceló
Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection
J. Chromatogr. A **823** (1998) 129-136
103. S. Guenu, M.-C. Hennion
Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides
J. Chromatogr. A **737** (1996) 15-24
104. D. Barceló, M.-C. Hennion
On-line sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters
Anal. Chim. Acta **318** (1995) 1-41
105. C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé
On-line and off-line solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene-membrane extraction disks for determining pesticides in water by reversed-phase liquid chromatography-diode array detection
J. Chromatogr. A **754** (1996) 77-84
106. J.M. Soriano, B. Jiménez, M.J. Redondo, J.C. Moltó
Comparison of different sorbents for on-line liquid-solid extraction followed by high-performance liquid chromatographic determination of nitrogen-containing pesticides
J. Chromatogr. A **822** (1998) 67-73
107. R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M. Brinkmann
Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry
J. Chromatogr. A **794** (1998) 187-199
108. R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull
Influence of the Organic Solvent in On-Line Solid Phase Extraction for the Determination of PAHs by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection
J. High Resol. Chromatogr. **21** (1998) 667-670
109. J. Lintelmann, K. Waadt, R. Sauerbrey, A. Kettrup
On-site solid phase extraction and coupled-column high-performance liquid chromatographic determination of six polycyclic aromatic hydrocarbons in water
Fresenius' J. Anal. Chem. **352** (1995) 735-742
110. J.L. Bernal, M.J. Nozal, L. Toribio, M.L. Serna, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull
Determination of Phenolic Compounds in Water Samples by On-Line Solid-Phase Extraction-Supercritical-Fluid Chromatography with Diode-Array Detection
Chromatographia **46** (1997) 295-300

111. M.A. Crespín, E. Ballesteros M. Gallesom M. Valcárcel
Trace enrichment of phenols by on-line solid-phase extraction and gas chromatographic determination
J. Chromatogr. A **757** (1997) 165-172
112. E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull
Liquid Chromatography of Phenolic Compounds in Natural Water Using On-Line Trace Enrichment
Chromatographia **40** (1995) 85-90
113. C.-S. Lu, S.-D. Huang
Trace determination of aromatic amines or phenolic compound in dyestuffs by high-performance liquid chromatography with on-line preconcentration
J. Chromatogr. A **696** (1995) 201-208
114. V. Coquart, M.-C. Hennion
Trace-Level Monitoring of Chloroaniline in Environmental Waters Using On-Line Trace-Enrichment and Liquid Chromatography with UV and Electrochemical Detection
Chromatographia **37** (1993) 392-398
115. K.-S. Boos, C.-H. Grimm
High-Performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings
Trends Anal. Chem. **18** (1999) 175-180
116. T.E. Gundersen, R. Blomhoff
On-line Solid-Phase Extraction and Isocratic Separation of Retinoic Acid Isomers in Microbore Column Switching System
Methods Enzym. **299** (1999) 430-441
117. J.A. Pascual, J. Sanagustín
Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection
J. Chromatogr. B **724** (1999) 295-302
118. A. Marchese, C. Mc Hugh, J. Kehler, H. Bi
Determination of Pranlukast and Its Metabolites in Human Plasma by LC/MS/MS with PROSPEKT™ Online Solid-Phase Extraction
J. Mass Spec. **33** (1998) 1071-1079
119. H. Lindenblatt, E. Krämer, P. Holzmann Erens, E. Gouzoulis-Mayfrank, K.-A. Kovar
Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction
J. Chromatogr. B **709** (1998) 255-263
120. D.D. Perrin, B. Demsey, E.P. Serjeant
pK_s Prediction for Organic Acids and Bases
Chapman and Hall, London, 1981

121. C. Boucharat, V. Desauziers, P. Le Cloirec
Experimental design for the study of two derivatization procedures for simultaneous GC analysis of acidic herbicides and water chlorination by-products
Talanta **47** (1998) 311-323
122. D.E. Bradway, T. Shafik
Electron Capture Gas Chromatographic Analysis of the Amine Metabolites of Pestizides: Derivatization of Anilines
J. Chrom. Sci. **15** (1977) 322-328
123. B. Davis
Crown Ether Catalysed Derivatization of Carboxylic Acids and Phenols with Pentafluorobenzyl Bromide for Electron Capture Gas Chromatography
Anal. Chem. **49** (1977) 832-834
124. L. Pan, J. Pawliszyn
Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes
Anal. Chem. **69** (1997) 196-205
125. P. Wheelan, J.A. Zirrolli, R.C. Murphy
Analysis of Hydroxy Fatty Acids as Pentafluorobenzyl Ester, Trimethylsilyl Ether Derivatives by Electron Ionization Gas Chromatography/ Mass Spectrometry
J. Am. Soc. Mass Spectrom. **6** (1995) 40-51
126. M.T. Galceran, E. Moyano, J.M. Poza
Pentafluorobenzyl derivatives for the gas chromatographic determination of hydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols
J. Chromatogr. A **710** (1995) 139-147
127. N. Chalaux, J.M. Bayona, J. Albaigés
Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection in environmental matrices
J. Chromatogr. A **686** (1994)
128. P. Frazey, X. Rao, R. Spaulding, B. Beld, M. J. Charles
The power of pentafluorobenzyl alcohol chemical ionization/ion trap mass spectrometry to identify pentafluorobenzyl derivatives of oxygenated polar organics
Intern. J. Mass Spectr. **190/191** (1999) 343-357
129. H. Dieckmann, R. Kreuzig, M. Bahadir
Pentafluorobenzylation of the fungicide metabolite fenpropimorphic acid for GC/MS investigations of soil samples
Fresenius' J. Anal. Chem. **355** (1996) 183-186
130. H.D. Meiring, G. de Engelsman, A.P.J.M. de Jong
Determination of polar pesticides by phase-transfer catalysed derivatization and negative ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. **644** (1993) 357-365

131. A. Miki, H. Tsuchihashi, H. Yamano, M. Yamashita
Extractive pentafluorobenzoylation using a polymeric phase-transfer catalyst: a convenient one-step pretreatment for gas chromatographic analysis of anionic compounds
Anal. Chim. Acta **356** (1997) 165-175
132. A.J. Parker
Protic-Dipolar Aprotic Solvent Effects on Rates of Bimolecular Reactions
Chem. Rev. **69** (1969) 1-32
133. M. Sato, T. Mitsui
Rapid and simple determination of metamphetamine and amphetamine in blood by simultaneous extraction-derivatization
J. Pharma. Biomed. Anal. **16** (1997) 139-145
134. R. Haas, T.C. Schmidt, K. Steinbach, E. von Löw
Derivatization of aromatic amines for analysis in ammunition waste waters
II: Derivatization of methyl anilines by iodination with a *Sandmeyer*-like reaction
Fresenius' J. Anal. Chem. **361** (1998) 313-318
135. T.C. Schmidt, M. Less, R. Haas, E. von Löw, K. Steinbach, G. Stork
Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine
I: Derivatization
J. Chromatogr. A **810** (1998) 161-172

15 Anhang

15.1 Geräte

On-line-SPE/HPLC:

HPLC-System (Gynkotec, Germering)

Pumpe:	M480
Entgaser:	GT-103
Autosampler:	GINA 50
Säulenthmostatisierung:	Säulenofen STH 585
Diodenarraydetektor:	UVD 340-S (spektrale Auflösung 2 nm)
Steuerung und Datenaufnahme:	Gynkosoft, Version 5.50
Säule:	Purospher [®] RP-18 e, 5 µm, 25 mm x 3 mm mit Vorsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 10 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Motorschaltventil:	MSV 6
Pumpe. mit LC-Controller:	655A-11 (Merck, Darmstadt) L-5000

GC/ECD:

GC:	HP 5890 II + ausgestattet mit Autosampler-Einheit HP 7673 (Hewlett-Packard, Waldbronn), ausgestattet mit
Detektor:	ECD (Ni ⁶³), Temperatur: 300 °C, Make-Up-Gasfluß: ca, 20 mL/min
Injektor:	Temperatur: 250 °C, Split-Injektion (Splitverhältnis ca. 1:120)
Trärgas:	Stickstoff 5.0, nachgereinigt über Megasorb-Einheit von Messer-Griesheim (Frankfurt), Säulenvordruck 100 kPa
Säule:	J & W DB5 [(5%-phenyl)-methylpolysiloxan], 30 m, 0.25 mm ID, 0,25 µm d _f
Steuerung und Datenaufnahme:	Gynkosoft, Version 5.50 (Gynkotec, Germering)

GC/MS:

GC:	Varian Star 3800 (Varian, Darmstadt)
Autosampler:	Varian 8200CX
MS:	Varian Saturn 2000
Injektor:	Varian 1079 PTV-Injektor
Insertliner:	Fokus-Liner, 3,4 mm ID, mit Quarzwolle gefüllt
Trärgas:	1,5 mL Helium/min
Säule:	J & W DB-35ms, 30 m, 0.25 μ m ID, 0,25 mm d_f
MS-Bedingungen:	
Trap-Temperatur:	250 °C
Manifold-Temperatur:	55 °C
Transferline-Temperatur:	280 °C
Ionisation:	EI, 70 eV
Emission Current:	10 μ A
Scanbereich:	60-650 m/z
GC-Programm:	40 °C für 3 min, mit 50 °C/min auf 245 °C aufheizen, 5 min halten, mit 25 °C/min auf 330 °C aufheizen, 5 min halten

15.2 Chemikalien**15.2.1 Referenzsubstanzen**

Die in dieser Arbeit untersuchten Standardsubstanzen, ihre Bezugsquellen und Gefahrensymbole sind in Tab. 41 aufgeführt. Zur eindeutigen Kennzeichnung sind zusätzlich die CAS-Nr. angegeben. Alle Standardsubstanzen wurden in der höchst erhältlichen Reinheit bezogen.

Tab. 41: Standardsubstanzen mit CAS-Nr., Bezugsquelle und Gefahrensymbolen

Substanz	CAS-Nr.	Bezugsquelle	Gefahrensymbole
4-Nitroanilin	100-01-6	Baker	T
3,5-Dinitroanilin	618-87-1	Riedel-de Haën	T
4-Aminotoluol	106-49-0	Fluka	T
2,6-Diaminotoluol	823-40-5	Aldrich	Xn
2-Amino-4-nitrotoluol	99-55-8	Janssen	T
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	35572-78-2	Promochem	T
2,4-Diamino-6-nitrotoluol	6629-29-4	Promochem	T
2-Naphthylamin	91-59-8	Aldrich	T+
4-Aminobiphenyl	92-67-1	Aldrich	T; Xi
4-Chloranilin	106-47-8	Riedel-de Haën	T
3,4-Dichloranilin	95-76-1	Riedel-de Haën	T
2,4,5-Trichloranilin	636-30-6	Riedel-de Haën	T
2-Aminophenol	95-55-6	Riedel-de Haën	Xn
3-Aminophenol	591-27-5	Riedel-de Haën	Xn
4-Aminophenol	123-30-8	Riedel-de Haën	Xn
2-Amino-3-nitrophenol	603-85-0	Riedel-de Haën	Xn
2-Amino-4-nitrophenol	99-57-0	Riedel-de Haën	Xn
2-Amino-5-nitrophenol	121-88-0	Riedel-de Haën	Xn
4-Amino-2-nitrophenol	119-34--6	Riedel-de Haën	Xn
2-Aminobenzoessäure	118-92-3	Merck	Xi
3-Aminobenzoessäure	99-05-8	Merck	Xn
4-Aminobenzoessäure	150-13-0	Merck	Xn
2-Amino-4-nitrobenzoessäure	619-17-0	Aldrich	Xi
5-Amino-2-nitrobenzoessäure	13280-60-9	Merck	Xi
5-Amino-2-hydroxybenzoessäure	89-57-6	Aldrich	Xi

15.2.2 Weitere Chemikalien

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tab. 42 mit ihren Bezugsquellen und Reinheitsgraden aufgeführt.

Tab. 42: Verwendete Chemikalien mit Bezugsquellen und Reinheitsgrad

Chemikalie	Bezugsquelle, Reinheitsgrad
Methanol	Merck, zur HPLC-Analyse
Acetonitril	Roth, zur HPLC-Analyse
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, p.a.
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, p.a.
Pentafluorbenzylbromid	Fluka, puriss.
Aceton	Riedel-de Haën, zur HPLC-Analyse
Dimethylsulfoxid	Merck, für die GC-Analyse
Kaliumcarbonat	Fluka, p.a.
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, p.a.
Triethylamin	Fluka, p.a.
18-Crown-6	Fluka, purum
Iodwasserstoffsäure	Aldrich, 55%, unstabilisiert
Amidosulfonsäure	Aldrich, A.C.S.-Reagenz
Natriumnitrit	Riedel de Haën, p.a.
Natriumsulfit	Merck, p. a.
Natriumhydroxid	Merck, p. a.
Cyclohexan	Riedel de Haën

15.2.3 Festphasen

Macherey-Nagel: Chromabond HR-P (Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer),
 gepackt in HPLC- Vorsäule (10 x 3 mm)
 Oberfläche: 1300 m²/g

- Macherey-Nagel: Chromabond HR-P (Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer)
3 mL, 200 mg
Oberfläche: 1300 m²/g
- Hamilton: PRP-1 (Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer),
gepackt in HPLC- Vorsäule (10 x 3 mm)
Oberfläche: 415 m²/g

15.2.4 Lösungen

Reagenzlösung für Pentafluorbenzylierung:

Die Reagenzlösung enthielt Pentafluorbenzylbromid ($c = 25 \mu\text{L/mL}$) und 18-Krone-6 ($c = 10 \text{ mg/L}$) in Aceton

Pufferlösung für HPLC:

15 mmol Kaliumdihydrogenphosphat und 15 mmol di-Kaliumhydrogenphosphat wurden in 1 L bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt und danach über einen Membranfilter (Porengröße 0,45 μm , Sartorius) vakuumfiltriert.

15.3 Optimierte Verfahren

15.3.1 On-line-SPE

Die Festphase wurde zunächst bei einer Fließrate von 1,0 mL/min mit 7 mL Acetonitril und 5 mL bidest. Wasser konditioniert. Anschließend wurden 50 mL Wasserprobe mit einer Fließrate von 5,0 mL/min über die Festphase geleitet. Danach wurde die Festphase bei einer Fließrate von 1,0 mL/min mit 3 mL bidest. Wasser gewaschen. Durch Umschalten des elektronischen Schaltventils wurden die Analyten auf die analytische Säule gespült. Die Trennung wurde bei 30 °C und einer Fließrate von 0,5 mL/min durchgeführt. Der Starteluent war ein Gemisch aus Acetonitril (A) und Phosphatpuffer (B, s. Kap. 15.2.4) im Verhältnis 28/72 (v/v). Diese Zusammensetzung wurde für 10 min gehalten. Danach wurde sie innerhalb von 10 min auf 40 % A und 60 % B geändert. Es folgte eine weitere Änderung auf 80 % A und 20 % B binnen 15 min. Diese Zusammensetzung wurde weitere 5 min gehalten. Die

Säule wurde anschließend, zeitgleich mit der On-line-Anreicherung mit dem Starteluenten equilibriert.

15.3.2 Optimierte Durchführung der Pentafluorbenzylierung

In einem 10 mL-Vial wurde ein Standardgemisch (je 50-100 µg Substanz) in jeweils 2 mL Aceton mit 50 µL einer Reagenzlösung ($c_{\text{PFBBR}} = 25 \text{ µL/mL}$; $c_{\text{(18-K-6)}} = 10 \text{ mg/mL}$ in Aceton) sowie 50 mg K_2CO_3 versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min im Wasserbad bei 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom fast bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand in 4 mL Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 1 mL Cyclohexan 15 min extrahiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden mittels GC/ECD untersucht. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils 1 µL des Extraktes injiziert.

Gaschromatographische Trennung der Derivate:

Das Injektionsvolumen betrug 1 µL. Die Trennung der Aminobenzoesäurederivate wurde mit folgendem Temperaturprogramm (Temperaturprogramm 1) durchgeführt: die Starttemperatur betrug 150 °C und wurde 10 min lang gehalten. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 8 min auf 240 °C erhöht, gefolgt von einer weiteren Erhöhung auf 260 °C innerhalb von 4 min. Diese Temperatur wurde 13 min gehalten. Um die Aminophenolderivate zu trennen, wurde folgendes Temperaturprogramm (Temperaturprogramm 2) verwendet: die Starttemperatur lag bei 150 °C. Es folgte eine Temperaturerhöhung auf 235 °C innerhalb von 8 min. Diese Temperatur wurde weitere 12 min gehalten.

15.3.3 Optimierte Durchführung der Iodierung

Nach der Pentafluorbenzylierung wurde die Aceton-Lösung im Stickstoffstrom bei 40 °C bis auf ein Volumen $\leq 0,5 \text{ mL}$ eingengt. Zur Probe wurden 5 mL bidest. Wasser gegeben und dieser Lösung 200 µL Iodwasserstoffsäure (55 %) und 500 µL Natriumnitrit-Lösung ($c = 10 \text{ g/L}$) zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min wurde 1 mL Amidosulfonsäure-Lösung ($c = 50 \text{ g/L}$) zugefügt und die Lösung 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 5 min im Wasserbad bei 100 °C erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Zerstörung des verbliebenen Iodüberschusses wurde die Lösung mit 250 µL einer gesättigten Natriumsulfit-Lösung versetzt und anschließend mit 500 µL Natronlauge

($c = 10 \text{ mol/L}$) alkalisiert. Die Derivate wurden mit 1 mL Cyclohexan 15 min extrahiert und die erhaltenen Extrakte mittels GC/ECD bzw. GC/MS analysiert.

Gaschromatographische Trennung der Derivate:

Das Injektionsvolumen betrug 1 μL . Die Trennung der iodierten Aminobenzoesäurederivate erfolgte mit Temperaturprogramm 1. Um die iodierten Aminophenolderivate zu trennen, wurde folgendes Temperaturprogramm (Temperaturprogramm 3) verwendet: die Starttemperatur lag bei 150 °C. Es folgte eine Temperaturerhöhung auf 230 °C innerhalb von 10 min. Diese Temperatur wurde 7 min gehalten. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 3 min auf 260 °C erhöht und die Temperatur weitere 5 min gehalten.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Fachbereich Chemie und am Bereich Umwelthygiene des Instituts für Immunologie der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Stork danke ich für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit und die Eigenständigkeit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas einräumte. Durch seinen plötzlichen Tod war es ihm leider nicht vergönnt, den erfolgreichen Abschluß der Arbeit mitzuerleben.

Herrn Professor Dr. W. Ensinger danke ich dafür, daß er die Betreuung dieser Arbeit übernommen und mich in allen Belangen unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. A. Seubert möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit zu begutachten.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Bereichs Umwelthygiene des Instituts für Immunologie für ihre Unterstützung während dieser Zeit und das nette Arbeitsklima. Stellvertretend seien hier Dr. Thorben Bonarius, Lothar Kaminski, Dr. Eberhard von Löw und insbesondere Thomas Zimmermann genannt, der liebenswerter Weise bereit war, mir bei der Korrektur dieser Arbeit zu helfen. Außerdem haben Dr. Thorben Bonarius und Thomas Zimmermann die Untersuchungen mittels GC/MS für mich durchgeführt.

Meinen Arbeitskreiskollegen (auch ehemalige und assoziierte) Alex, Bani, Burkhard, Christoph, Claudi, Daniel, Falk, Henry, Isa, Nicole, Oswin, Sonja, Thorben, Yun-Young und Zimbo danke ich für das tolle Arbeitsklima und die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbracht habe.

Ich danke meinen Freunden, vor allem Astrid, Michaela und Tanja, die immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Mein innigster Dank gilt meiner Familie, die mich in all den Jahren nach Kräften unterstützt hat.