

Analytik aromatischer Amine in wässrigen und
biologischen Matrices

Neue Verfahren zur Anreicherung und selektiven Detektion

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Thomas Zimmermann

aus Wilhelmshaven

Marburg/Lahn 2005

Die Arbeit entstand in der Zeit von 10/2000 bis 07/2005 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg und wurde am 8. Juli 2005 als Dissertation angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Ensinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Werner Engewald

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2005

Ein Gedanke kann nicht erwachen,
ohne andere zu wecken.

Marie Freifrau von Ebner-Eschenbach

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachbereich Chemie und am Institut für Immunologie und Umwelthygiene der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Oktober 2000 bis Juli 2005 unter Anleitung von Dr. Torsten Schmidt und Prof. Dr. Wolfgang Ensinger.

Prof. Dr. Wolfgang Ensinger danke ich für die Betreuung der Arbeit und die vielen Freiheiten, die er mir gewährt hat. Mein besonderer Dank gilt Dr. Torsten Schmidt von der Universität Tübingen, dessen Arbeiten ich fortgeführt habe. Er hat mich trotz der örtlichen Distanz und einer Vielzahl weiterer Verpflichtungen stets intensiv beraten und sich sehr für meine Belange eingesetzt.

Den Professoren Dr. Werner Engewald, Dr. Gerd Hilt und Dr. Jörg Lorberth sowie Herrn Dr. Torsten Schmidt danke ich für den Beisitz bei der Disputation. Hervorheben möchte ich Prof. Dr. Werner Engewald der Universität Leipzig, der das Koreferat übernommen und mir Wasserproben von Rüstungsaltslasten zur Verfügung gestellt hat.

Die ersten Arbeiten zu dieser Dissertation wurden am Institut für Immunologie und Umwelthygiene durchgeführt. Bedauerlicherweise und für alle Mitarbeiter überraschend wurde das Institut Ende 2002 geschlossen. Ich danke den Kollegen für die schöne Zeit und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. Klaus Steinbach bin ich für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung des GC-AED zu Dank verbunden. Von Beginn an hat er großes Vertrauen in mich gesetzt und mich jederzeit fachlich beraten. Bei apparativen Problemen hat er mir stets zur Seite gestanden.

Die Arbeiten zum Thema aromatische Amine in Urin bauen auf der Diplomarbeit von Stefanie Pötz auf, bei der ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. Zudem möchte ich auch auf meine Probanden hinweisen, die ohne Rücksicht auf die eigene Gesundheit geraucht und mich mit Urin versorgt haben.

Für ihre Hilfsbereitschaft bei der Recherche und Beschaffung der Literatur bin ich Frau Becht-Schröder von der Bibliothek des Fachbereichs Chemie sehr verbunden.

Unterstützt haben mich die Firma Restek, die mir die GC-Säule zur Verfügung gestellt haben und die Firma JAS, deren GC-AED/MS ich benutzen durfte.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Ensinger Daniel, Henrik, Falk, Yun-Young, Christoph und Jens sowie den Ehemaligen Claudia, Isa, Sonja, Melanie, Thorben und Henry möchte ich für viele schöne Stunden danken. Ich bin Thorben und Henry sehr verbunden, auf deren Erfahrungen mit der Festphasenmikroextraktion ich zurückgreifen konnte, sowie Isa, mit der ich in unserem gemeinsamen Labor viel Spaß hatte.

Meinen Kollegen im anorganisch-analytischen Grundpraktikum speziell Francesca, Tina und Daniel sowie Herrn Dr. Frank Weller bin ich für die gute Zusammenarbeit und die langjährige Unterstützung dankbar. Hinweisen möchte ich auch auf meine Praktikanten Kai, Enrico, Christine, Viktoria, Anke, Felicitas, Nadine, Andreas, Benedikt, Sarah, Steffen, Birte, Katharina, Christiane, Melanie, Sebastian, Fabian und Ann-Katrin, die besonders am Ende der Doktorarbeit und nach der Geburt von Kai Arne nachsichtig waren. Annette, Marion, Tamara, Marie, Torsten, Christine, Katharina, Susanne, Martina, Stefanie, Noa, Michaela, Thomas, Roland, Johannes, Martin, Conny möchte ich darüber hinaus für ihren Beitrag zum Gelingen des Ferienpraktikums danken.

Zu erwähnen sind auch Heiko Beneken und Oliver Cordes, die mit mir die Grundlagen der Depletion-SPME diskutiert haben. Bei Oliver Cordes fanden zudem meine Fragen zu L^AT_EX stets ein offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt Claudia und Torsten für das geduldige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen Freunden, die mir in zahlreichen Gesprächen den nötigen Rückhalt gegeben und mir mit so mancher Idee weitergeholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich das Vertrauen und die große Geduld meiner Eltern anerkennen, die sie mir stets entgegengebracht haben. Ich kann nachvollziehen, dass es für Außenstehende oft nicht leicht war, meinen Werdegang nachzuvollziehen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Claudia, die mich über den langen Weg der Promotion hinweg begleitet und die Arbeit korrigiert hat. Sie hat mir stets zur Seite gestanden und mich beraten. Ich bin ihr für ihre Geduld und Nachsicht sehr verbunden, die sie schlechte Laune und ungebremsten Forscherdrang ertragen ließ.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Toxikologie aromatischer Amine	2
3	Zusammensetzung von Urin	6
4	Grundlagen der SPME	9
4.1	Theorie der Festphasenmikroextraktion	11
4.2	SPME für Verteilungsprozesse	15
4.3	Extraktionsparameter	18
4.3.1	Beschichtung	18
4.3.2	Durchmischung der Probe	20
4.3.3	Zusammensetzung der Probe	21
4.3.4	Probevolumen	22
4.3.5	Extraktionszeit	23
4.3.6	Extraktionstemperatur	24
4.3.7	Desorptionsbedingungen	25
5	Stand der Forschung	27
5.1	Extraktion aromatischer Amine	27
5.2	Trennung und Detektion	31
5.3	Derivatisierung aromatischer Amine	32
6	Aufgabenstellung	37
7	Ergebnisse	39
7.1	Derivatisierung	39
7.1.1	Durchführung	39
7.1.2	Reaktionsmechanismus	42
7.1.3	Reaktivität und Stoffumsatz	43
7.1.4	Nebenreaktionen	52
7.1.5	Stabilität der Derivate	55

7.1.6	Polarität der Derivate	60
7.1.7	Massenspektren der Derivate	63
7.2	Bestimmung der extrahierten Stoffmenge	66
7.2.1	Untersuchung von depletion-SPME	66
7.2.2	Validierung des Verfahrens	72
7.2.3	Bestimmung der extrahierten Stoffmenge nach Derivatisierung	82
7.3	Screening	87
7.3.1	Trennung der Derivate	87
7.3.2	Detektion mit AED	90
7.3.2.1	Makeup-Fluss	90
7.3.2.2	Reaktandgase	93
7.3.3	Headspace-SPME	96
7.3.3.1	Aufbau und Durchführung	96
7.3.3.2	Vergleich der SPME-Fasern	98
7.3.3.3	Einfluss der Extraktionstemperatur	102
7.3.3.4	Variation der Extraktionszeit	105
7.3.3.5	Bedeutung der Salzzugabe	110
7.3.3.6	Position der SPME-Faser in der Probe	112
7.3.3.7	Vergleich von direkter Extraktion und Headspace-SPME	114
7.3.3.8	Reproduzierbarkeit	117
7.3.4	Aromatische Amine in Proben von Rüstungsaltslasten	120
7.3.5	Aromatische Amine im Urin	127
7.3.5.1	Probenahme und Aufbewahrung	129
7.3.5.2	Hydrolyse	131
7.3.5.3	Ausschütteln	136
7.3.5.4	Extraktion der Derivate mit SPME	141
7.3.5.5	Bestimmung mit GC-AED	142
7.3.5.6	Bestimmung mit GC-AED/MS	149
7.3.5.7	Bestimmung mit GC-MS	154
7.4	Quantifizierung	164
7.4.1	Trennung und Identifizierung der Substanzen	164

7.4.1.1	Gaschromatographische Trennung der Derivate	164
7.4.1.2	Vergleich mit einer anderen Trennsäule	169
7.4.1.3	Massenspektrometrische Detektion	171
7.4.1.4	Einfluss der Trap-Temperatur	173
7.4.2	Direct-SPME	175
7.4.2.1	Durchführung	175
7.4.2.2	Vergleich verschiedener SPME-Fasern	177
7.4.2.3	Bestimmung der Äquilibrierungszeiten	180
7.4.3	Validierung	183
7.4.3.1	Reproduzierbarkeit	183
7.4.3.2	Bestimmung der Wiederfindungsrate	187
7.4.3.3	Einfluss von Reagenzien und SPME-Faser	190
7.4.3.4	Verschleppung	194
7.4.3.5	Kalibrierung der Methode	194
7.4.3.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	196
7.4.4	Untersuchung von Realproben	199
7.4.5	Vergleich mit Standardaddition	203
8	Diskussion	206
8.1	Derivatisierung	206
8.2	Extraktion der Derivate	209
8.3	Depletion-SPME	212
8.4	Trennung und Identifizierung	214
8.5	Screening mit paralleler Detektion	216
8.6	Quantifizierung	221
9	Zusammenfassung und Ausblick	225
10	Experimenteller Teil	227
10.1	Geräte	227
10.1.1	Sonstige Geräte	229
10.1.2	SPME-Fasern	229

10.2	Chemikalien	230
10.3	Verwendete Lösungen	233
10.3.1	Herstellung der Stammlösungen	233
10.3.2	Herstellung der Standard-Lösungen	233
10.3.3	Lösungen für die Kalibrierung	234
10.3.4	Lösungen für die Standardaddition	235
10.3.5	Herstellung der Pufferlösung	236
10.4	Optimierte Verfahren	236
10.4.1	Konditionierung der SPME-Fasern	236
10.4.2	Reinigung der Glasgeräte und Silanisierung	236
10.4.3	Vorbereitung der Urinproben	237
10.4.4	Derivatisierung	238
10.4.5	Derivatisierung-SPME	239
10.4.6	Depletion-SPME	240
10.5	Realproben	240
10.5.1	Wasserproben von Rüstungsalzlasten	240
10.5.2	Probenahme und Lagerung des Urins	241
11	Literaturverzeichnis	242
12	Anhang	275
12.1	Massenspektren der Derivate	275
12.2	Chromatogramme von Wasserproben der Rüstungsalzlasten	282
12.3	Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers	288

Tabellenverzeichnis

1	Zusammensetzung von Urin	6
2	Nachgewiesene aromatische Amine	8
3	Übersicht über die erhältlichen SPME-Fasern	19
4	Parameter zur Trennung der Derivate mit der HP5-Säule	44
5	Parameter zur Trennung von Einzelstandards mit HPLC-UV	46
6	Stoffumsatz bei der Derivatisierung	48
7	Parameter zur Trennung von Anilinen und Derivaten mit HPLC-UV	49
8	Identifizierte Nebenprodukte	54
9	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten	62
10	Untersuchte Verbindungen bei depletion-SPME	67
11	Parameter zur Trennung und Detektion bei depletion-SPME	68
12	Extraktionsraten für 100 µm PDMS-Faser	71
13	Mittlere Extraktionsrate und Reproduzierbarkeit	76
14	Extraktionsraten bei unterschiedlichen Analytkonzentrationen	78
15	Vergleich von depletion-SPME und Flüssiginjektion	81
16	Extraktionsraten aromatischer Amine nach Derivatisierung	84
17	Verteilungskoeffizienten aromatischer Amine	86
18	Parameter zur Trennung und Detektion mit GC-AED	87
19	Für das Screening untersuchte Verbindungen	89
20	Parameter für die Headspace-Extraktion	97
21	Variation der Extraktionstemperatur	104
22	Äquilibrierungszeiten für Headspace-SPME	108
23	Vergleich von direct- und Headspace-SPME	115
24	Parameter für die Trennung und Detektion nitroaromatischer Amine	121
25	Retentionszeiten der Derivate nitroaromatischer Amine für GC-AED	123
26	Übersicht über die nachgewiesenen Amine	126
27	Wiederfindungsraten und Relative Standardabweichung nach LLE	139
28	Parameter zur Bestimmung aromatischer Amine mit GC-AED/MS	149
29	Parameter zur Bestimmung aromatischer Amine mit GC-MS	155

30	Identifizierte Verbindungen im Urin	158
31	Parameter zur Trennung der Derivate mit der Stx-CLPesticides-Säule . .	165
32	Retentionszeiten der Derivate	167
33	Parameter zur Trennung der Derivate mit der DB5-ms-Säule	169
34	Parameter der massenspektrometrischen Detektion	171
35	Charakteristische Fragmentationen der Derivate	172
36	Parameter für die direkte Extraktion der Derivate	175
37	Äquilibrierungszeiten bei direkter Extraktion	182
38	Reproduzierbarkeit des Verfahrens für verschiedene Matrices	184
39	Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices	188
40	Kalibrierung mit Derivatisierung-SPME-GC-MS	195
41	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Verfahrens	197
42	Aromatische Amine in Realproben	200
43	Nachgewiesene Aniline im Abwasser der Rüstungsalzlast Elsnig	204
44	Verwendete Grundchemikalien	230
45	Als Referenzsubstanzen verwendete aromatische Amine	231
46	Als Referenzsubstanzen verwendete Pestizide	233
47	Konditionierung der SPME-Fasern	237
48	Wasserproben der Rüstungsalzlast Elsnig	241

Abbildungsverzeichnis

1	Metabolismus aromatischer Amine	4
2	Aufbau der kommerziell erhältlichen SPME-Extraktionseinheit	9
3	Vergleich von direkt- und Headspace-SPME	11
4	Derivatisierungsreaktionen aromatischer Amine	33
5	Schematische Darstellung der Derivatisierung	40
6	Einfluss der Säuremenge auf die Derivatisierung	45
7	Stoffumsatz am Beispiel von 2A4NT	47
8	Einfluss der Nitrit-Menge auf die Derivatisierung	51
9	Einfluss der Nitrit-Menge auf den Stoffumsatz	52
10	Stabilität der Derivate in Acetat-Puffer	56
11	Stabilität der Derivate in NH ₃ -Puffer	58
12	Durch Diazotierung zugängliche Verbindungen	60
13	Massenspektrum von 2-Iod-4,6-dinitrotoluol	63
14	Vergleich der Massenspektren von 2A4,6DNT	64
15	Strukturen der bei depletion-SPME verwendeten Pestizide	68
16	Chromatogramme zur Abreicherung der Pestizide	69
17	Abnahme der Peakflächen als Funktion der Zahl der Extraktionen	70
18	Einfluss der Zahl an Extraktionsschritten auf die Extraktionsrate	73
19	Extraktionsprofil bei Extraktion basierend auf Adsorption	77
20	Einfluss der Analytkonzentration auf die Extraktionsrate von Lindan	79
21	Mehrfache Extraktion aromatischer Amine nach Derivatisierung	83
22	Chromatogramm eines Standards nach Derivatisierung und LLE	88
23	Einfluss des Makeup-Flusses	91
24	Einfluss der Reaktandgase	94
25	Apparatur für die manuelle Festphasenmikroextraktion	96
26	Vergleich der Chromatogramme unterschiedlicher SPME-Fasern	99
27	Vergleich verschiedener Fasern bei Headspace-SPME	101
28	Einfluss der Temperatur auf die Extraktion aus dem Headspace	103
29	Äquilibrierungskurven der Derivate für Headspace-SPME	107
30	Einfluss der Salzkonzentration auf die extrahierten Stoffmengen	111

31	Position der Faser in der Probe	113
32	Vergleich von direkter und Headspace-Extraktion	116
33	Chromatogramm nitroaromatischer Amine nach Derivatisierung	122
34	Identifizierung nitroaromatischer Amine nach Derivatisierung	125
35	Vorbereitung der Urinproben	127
36	Einfluss der Probenvorbereitung	130
37	Bedeutung der Hydrolyse	132
38	Vergleich von saurer und basischer Hydrolyse	133
39	Beeinflussung der aromatischen Amine durch die Hydrolyse	135
40	Bedeutung des Ausschüttelns	137
41	Vergleich von direkt- und Headspace-Extraktion	141
42	Chromatogramme einer Urinprobe ohne Derivatisierung	144
43	Störung der Derivatisierung	145
44	Vergleich verschiedener Urinproben mit GC-AED	146
45	Vergleich von AED und MS	151
46	Identifizierung alkylierter Amine	153
47	Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers	157
48	Vergleich der Urinproben von Rauchern und Passivrauchern	163
49	Chromatogramm eines Standards mit der Stx-CLPesticides	166
50	Trennung der Derivate über die Einzelmassenspuren	168
51	Chromatogramm eines Standards mit der DB5-ms	170
52	Einfluss der Trap-Temperatur	174
53	Vergleich verschiedener SPME-Fasern bei direkter Extraktion	179
54	Äquilibrierungskurven bei direkter Extraktion	181
55	Einfluss des Internen Standards	186
56	Day-to-day- Reproduzierbarkeit	191
57	Vergleich verschiedener Fasern	193
58	Chromatogramm und Massenspektrum des Derivats von 4CA	198
59	Chromatogramm einer stark belasteten Probe	201
60	Chromatogramm der Probe S16	202
61	Ausschnitte aus dem Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers	288

Abkürzungsverzeichnis

AA	Essigsäureanhydrid (<i>acetic acid anhydride</i>)
AED	Atomemissionsdetektor
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
calc.	berechnet (<i>calculated</i>)
Car	Carboxen
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CIC	verbindungsunabhängige Kalibrierung (<i>compound independent calibration</i>)
CW	Carbowax
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (<i>dissolved organic carbon</i>)
DVB	Divinylbenzen
ECD	Elektroneneinfangdetektor (<i>electron-capture detector</i>)
EI	Elektronenstoßionisation
EPC	elektronische Druckkontrolle (<i>electronic pressure control</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
exp.	experimentell
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GC	Gaschromatographie
GCB	graphitierter Kohlenstoff (<i>graphitized carbon black</i>)
ges.	gesättigt
Hal	Halogen
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid (<i>heptafluorobutyric acid anhydride</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ID	Innendurchmesser
I-Effekt	induktiver Effekt
IS	Interner Standard
LLE	Flüssig-flüssig-Extraktion (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LVI	<i>large volume injection</i>
M-Effekt	mesomerer Effekt
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
mLLE	Mikro-Flüssig-flüssig-Extraktion (<i>micro liquid-liquid extraction</i>)
MS	Massenspektrometrie

MZ	Molekülmassenzahl
n.	nachgewiesen
n.n.	nicht nachgewiesen
NCI	negative chemische Ionisation (<i>negative chemical ionization</i>)
NEDA	N-1-Naphthyl-ethylendiamin
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PA	Polyacrylat
PAH	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (<i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
PCB	polychlorierte Biphenyle
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFPA	Pentafluorpropionsäureanhydrid (<i>pentafluoropropionic acid anhydride</i>)
PS	Polystyrol
PTV	<i>Programable Temperature Vaporizer</i>
Quan.ion	Quantifizierung
Rec.	Wiederfindung (<i>recovery</i>)
Ref.	Referenz
Rel. Int.	Relative Intensität
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RSD	Relative Standardabweichung (<i>relative standard deviation</i>)
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>signal-to-noise ratio</i>)
SBSE	<i>stir bar sorptive extraction</i>
SIM	Einzelmassen-Registrierung (<i>selected ion monitoring</i>)
SPAD	Festphasen-Derivatisierung (<i>solid-phase analytical derivatization</i>)
SPDE	<i>solid-phase dynamic extraction</i>
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Festphasenmikroextraktion (<i>solid-phase microextraction</i>)
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid (<i>trifluoroacetic acid anhydride</i>)
TIC	Totalionenstrom (<i>total ion count</i>)
TMS	Trimethylsilyl
TPR	<i>templated resin</i>
t _R	Retentionszeit
TSP	Thermospray
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
VOC	flüchtige organische Verbindungen (<i>volatile organic compounds</i>)

1 Einleitung

Aromatische Amine sind wichtige Grundchemikalien bei der Herstellung von Farben, Pharmazeutika, Kunststoffen und Pflanzenschutzmitteln [1]. Sie werden als Stabilisatoren in Holzschutzmitteln und synthetischen Schmierölen eingesetzt sowie als Vulkanisationsbeschleuniger in der Gummiverarbeitung [2–4].

Im Abwasser kommunaler wie industrieller Quellen gelangen die aromatischen Amine schließlich in den Wasserkreislauf. Allein die jährliche Anilin-Emission in die Umwelt wird auf 10000 t geschätzt [2].

Weniger punktuell sind Emissionen, die durch den Abbau aromatischer Verbindungen freigesetzt werden. Im Vordergrund stehen nitroaromatische Verbindungen [5–8], die mittlerweile mehr als 10 % des Gesamtverkaufs der chemischen Industrie ausmachen und neben Sprengstoffen, Pharmazeutika und Pestiziden zu mehr als 95 % für die Kunststoff- und Gummiproduktion verwendet werden [5]. Die Bioakkumulation und der Abbau zu Aminoverbindungen hat in den USA zur Klassifizierung der Nitroaromaten als „Priority pollutants“ geführt [8].

Darüber hinaus werden aromatische Amine als Abbauprodukte von Azofarbstoffen [8, 9] und Pflanzenschutzmitteln [8, 10, 11] freigesetzt. Die Toxizität bleibt bei den Metaboliten der Pestizide verglichen mit den Ausgangssubstanzen erhalten oder nimmt sogar noch zu [12]. Bisher wurden mehr als 30 Aniline als Metaboliten von Aniliden, Carbamaten, Nitrophenolen und Phenylharnstoff-Pestiziden nachgewiesen [10, 11, 13, 14]. Allein die jährliche Emission von 4-Chloranilin, das zu einem der wichtigsten Abbauprodukte gezählt wird, wird auf 1000 bis 10000 t geschätzt [2].

Der Mensch gelangt aber auch unmittelbar durch den berufsbedingten Umgang mit aromatischen Aminen bzw. deren Folgeprodukten in Kontakt. So wurden im Urin und Blut von Arbeitern in landwirtschaftlichen Betrieben [11, 15, 16], der Farben- [17, 18] und vermehrt der Kunststoffindustrie [19–27] Aniline nachgewiesen.

Daneben gibt es zahlreiche diskrete Quellen, durch die aromatische Amine in den menschlichen Körper gelangen können. Diskutiert wurde die Bedeutung des Zigarettenrauches [8, 28–30], Kraftstoffemissionen [31–34] und der Einsatz von Kosme-

tikartikeln [35, 36]. Aniline wurden in Malfarben für Kinder [37] sowie in künstlichen Süßstoffen [38] nachgewiesen.

Die weite Verbreitung aromatischer Amine wird deutlich bei der Untersuchung von Anilinen in Luft. An einer Vielzahl von Stellen konnten in Ballungsräumen verschiedene Aniline bestimmt werden [39]. Dies könnte erklären, warum auch im Urin von Testpersonen, die keiner Risikogruppe angehören, ein breites Spektrum aromatischer Amine nachgewiesen wurde [15, 40]. Nichts desto trotz sind nicht alle Quellen ausreichend untersucht. Dies gilt besonders für die extrem toxischen polycyclischen Nitroaromaten, die im Körper zu Aminen reduziert werden [32, 41]. Erst seit kurzer Zeit ist man darauf aufmerksam geworden, dass Lokalanästhetika wie Lidocain zu aromatischen Aminen metabolisiert werden, die im Körper als Hämoglobin-Addukte nachgewiesen wurden [42, 43].

In Anbetracht der weiten Verbreitung aromatischer Amine sind leistungsfähige Analyseverfahren erforderlich, die einen hohen Probendurchsatz gewährleisten. Da insbesondere bei biologischen Matrices die verfügbare Probenmenge gering ist, spielt für die Empfindlichkeit die Effizienz eine große Rolle, mit der die vorhandene Stoffmenge für die Analyse genutzt wird. Verbesserungsbedarf besteht insbesondere bei den biologischen Matrices, bei denen die Analyse üblicherweise auf der klassischen aber mit vielen Problemen behafteten Flüssig-flüssig-Extraktion beruht. Da sich insbesondere polare Amine nur schwer anreichern lassen, wurden die im menschlichen Körper auftretenden aromatischen Amine bislang nicht umfassend untersucht.

2 Toxikologie aromatischer Amine

Von den primären aromatischen Aminen wurden 90 % als kanzerogen eingestuft [44]. REHN beobachtete bereits 1895 vermehrte Fälle von Blasenkrebs bei Anilin-Arbeitern [45]. Von der IARC (International Agency for Research on Cancer) wurden 6 der in dieser Arbeit untersuchten aromatischen Amine für den Menschen als kanzerogen (Gruppe 1: 4AB, 2NaA, Benzidin) bzw. wahrscheinlich kanzerogen (Gruppe 2A: 4C2MA,

2AT, MOCA) eingestuft [46], aber zahlreiche weitere verursachten Tumore in Tieren [47]. Darüber hinaus führten eine Vielzahl aromatischer Amine zu DNA-Schäden und in vitro zu positiven Befunden bei Mutagenitäts-Tests (z.B. nach AMES) [47].

Die Arylamine werden über den Gastrointestinaltrakt, die Atemwege und die Haut sehr gut resorbiert. Darüber hinaus werden Nitroaromaten ebenso wie Azofarbstoffe endogen durch Reduktasen zu aromatischen Aminen umgewandelt. Die Halbwertszeit der Verbindungen im Körper beträgt durchschnittlich 3-4 Stunden, einige Amine wie 1,4DAB sind mit Halbwertszeiten zwischen 2 und 4 Tagen wesentlich persistenter.

Der Abbau aromatischer Amine im menschlichen Körper ist gut untersucht [44, 49–51]. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend erst nach Metabolisierung in der Leber. Von entscheidender Bedeutung ist die metabolische Aktivierung durch ein konstitutives Isoenzym von Cytochrom P₄₅₀ (CYP1A2 und CYP3A4). Diese Monooxygenasen sind für die Hydroxylierung am Ring ebenso wie am Stickstoffatom verantwortlich. Die Ringhydroxylierung ist irreversibel und die gebildeten Aminophenole werden direkt bzw. nach Umsetzung mit Uridin-Diphosphat-Glucuronosyl-Transferase (UGT) oder Sulfatase (SULF) ausgeschieden. Dagegen entstehen durch die N-Hydroxylierung aromatische Hydroxylamine, die für die Giftwirkung verantwortlich gemacht werden.

Als Konkurrenzreaktion zur Cytochrom-P₄₅₀-vermittelten Oxidation findet Acylierung durch das cytosolische Enzym N-Acetyltransferase NAT statt. Durch diese Entgiftungsreaktion wird das Stickstoffatom blockiert und ein nachfolgender Angriff von Cytochrom P₄₅₀ führt ausschließlich zu ringhydroxylierten Produkten. Etwa die Hälfte der Metaboliten werden über den Urin auf diese Weise oder als Glucuronide bzw. Sulfate ausgeschieden. Innerhalb der Bevölkerung unterliegt die N-Acetyltransferase einem genetischen Polymorphismus, der die interindividuellen Unterschiede erklärt. Schnelle Acetylierer fangen die Amine rasch ab, während bei langsamen Acetylierern weit mehr Hämoglobin-Addukte nachweisbar sind.

Der Transport der in der Leber gebildeten Phenylhydroxylamine erfolgt über das Blut in die Niere, wo sie über die Harnblase ausgeschieden werden. Die Hydroxylamine sind reaktiv und werden teilweise im Blut durch Hämoglobin oxidiert. Dabei werden Methämoglobin und Nitrosobenzole gebildet, die ihrerseits wieder mit Glutathion GSH oder den

Cystein-Resten des Hämoglobins zu stabilen Addukten reagieren. Weit weniger reaktiv als die Hydroxylamine sind die Glucuronide, die durch Reaktion mit UGT gebildet werden. In dieser Transport-Form gelangen die aromatischen Amine gleichfalls in die Harnblase. Dort werden sie entweder ausgeschieden oder durch β -Glucuronidasen gespalten.

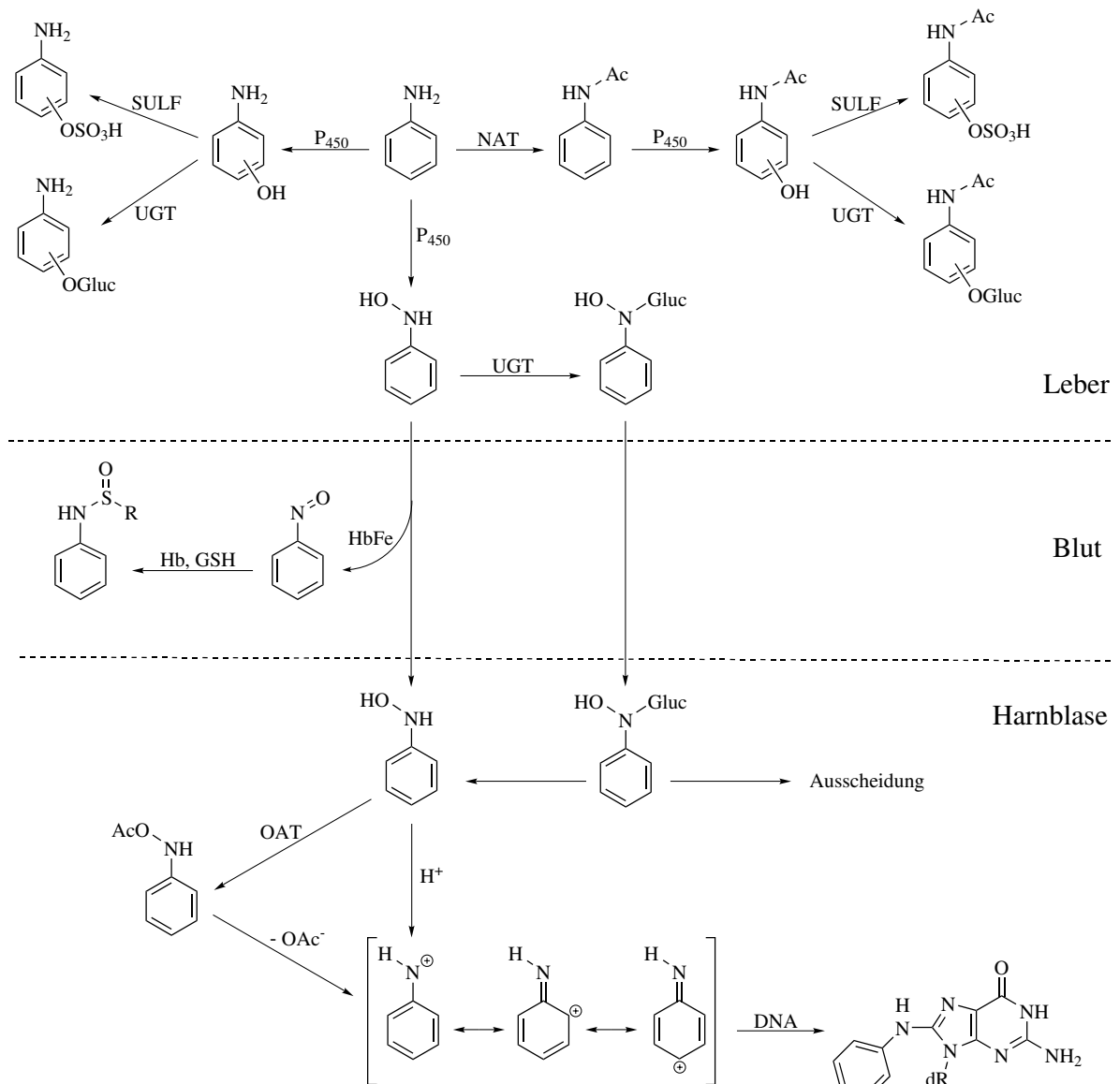


Abbildung 1: Vereinfachter Metabolismus aromatischer Amine nach BELAND *et al.* [48] (P₄₅₀ - Cytochrom P₄₅₀, NAT - N-Acetyl-Transferase, OAT - O-Acetyl-Transferase, Hb - Hämoglobin, GSH - Glutathion, SULF - Sulfatase, UGT - Uridin-Diphosphat-Glucuronosyl-Transferase, Gluc - Glucuronid, dR - Desoxyribose)

Unter sauren Bedingungen stellt die Hydroxyl-Gruppe der Phenylhydroxylamine eine gute Abgangsgruppe dar. Dies gilt besonders, wenn die Hydroxy-Gruppe zuvor durch O-Acetyltransferase aktiviert wurde. Die entstehenden mesomeriestabilisierten Nitrenium-Ionen stellen die letztendlichen (ultimalen) Kanzerogene dar. Sie sind stark elektrophil und reagieren mit den Guanin-Basen der DNA.

Statt der DNA-Addukte erfolgt das Monitoring meist über die Hämoglobin-Addukte, da diese leichter und in größerer Menge zugänglich sind. Zudem enthält Hämoglobin nur knapp 300 Aminosäuren mit bekannter Sequenz. Bei dieser Vorgehensweise wird vorausgesetzt, dass sich Verbindungen, die an dem Protein-Rest des Hämoglobins binden, sich ähnlich gegenüber DNA verhalten. Im Gegensatz zum Urin können die stabilen Hämoglobin-Addukte noch lange nach der Exposition nachgewiesen werden, da ihre Beständigkeit nur durch die Lebensdauer der Erythrocyten (120 d beim Menschen) begrenzt wird.

3 Zusammensetzung von Urin

Urin wird in der Niere gebildet und anschließend über die Harnblase ausgeschieden. Die Menge ebenso wie die Zusammensetzung sind erheblichen Schwankungen unterworfen und stark von der Ernährung sowie der Flüssigkeitsaufnahme abhängig. Durchschnittlich scheidet ein gesunder Erwachsener etwa 1 L pro Tag aus, die Menge kann aber zwischen 0,5 und 2,5 L variieren [52, 53]. Der pH-Wert des Urins bewegt sich im Bereich 4,8 - 7,5. Ebenso unterliegen auch die Inhaltsstoffe physiologischen Schwankungen, weshalb deren Menge in der Regel auf den 24h-Urin bezogen wird. In Tab. 1 sind die anorganischen und organischen Hauptbestandteile des 24h-Urins eines gesunden Erwachsenen aufgeführt. Darüber hinaus ist eine Vielzahl weiterer Verbindungen in geringer Konzentration enthalten. Dazu zählen organische Säuren wie Citronensäure und einige Vitamine.

Die Ausscheidung dient der Regulierung des körpereigenen Salzhaushalts. Darüber hinaus werden vom Körper nicht weiter verwertbare Stoffwechselprodukte ausgeschieden. Dazu zählen Ammoniak und CO₂ ebenso wie die Harnsäure aus dem Purinabbau. Hinzu

Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung von Urin. Aufgeführt sind die pro Tag durchschnittlich ausgeschiedenen Mengen der Hauptbestandteile [52].

Anorganische Bestandteile	Ausscheidung / (mmol/d)	Organische Bestandteile	Ausscheidung / (mmol/d)
Na ⁺	120 - 220	Harnstoff	210 - 480
K ⁺	35 - 80	Harnsäure	3
NH ₄ ⁺	20 - 70	Allantoin	0,1 - 0,2
Ca ²⁺	3 - 8	Kreatinin	13
Mg ²⁺	2 - 8	Kreatin	0,5
HCO ₃ ⁻	0 - 50	Aminosäuren	7
Cl ⁻	120 - 240	Glucose	0,4
HPO ₄ ²⁻ / H ₂ PO ₄ ⁻	30 - 40	Proteine	60 mg/d
SO ₄ ²⁻	30 - 70		

kommen auch Nährstoffe wie Aminosäuren, wenn diese die Nieren in hoher Konzentration passieren. Zudem dienen die Nieren der raschen Ausscheidung körperfremder toxischer Stoffe. Deshalb und aufgrund der leichten Verfügbarkeit ist der Urin für die medizinische Diagnostik von großer Bedeutung.

Angesichts der starken Schwankungen der Urinmenge werden die Inhaltsstoffe bei quantitativer Analyse häufig auf den Kreatinin-Gehalt bezogen. Dieser unterliegt im Gegensatz zur Urinmenge vergleichsweise geringen Schwankungen und wird vom Körper kontinuierlich ausgeschieden. Zudem ist die korrekte Probenahme beim 24h-Urin häufig umständlich und schwierig.

Aromatische Amine wurden angesichts ihrer Toxizität bereits vielfach im Urin untersucht. Tab. 2 gibt eine Übersicht über die bislang gefundenen aromatischen Amine. Abgesehen von arbeitsmedizinischen Untersuchungen zur berufsbedingten Belastung mit aromatischen Aminen beschäftigen sich die Studien ursächlich zumeist mit der Bedeutung des Rauchens und des Passivrauchens für das Krebsrisiko. Neben Urin wurden die aromatischen Amine häufig im Blut als Hämoglobin-Addukte bestimmt (vgl. Kap. 2).

Obwohl im Zigarettenrauch eine große Zahl nitro- und aminoaromatischer Verbindungen nachgewiesen wurde [85–88], wird die Zahl der im Urin bestimmten Amine auf die mit der höchsten Toxizität reduziert. So wurde überaus häufig das von der IARC als kanzerogen eingestufte 4AB [46] untersucht (vgl. Tab. 2). Abgesehen von alkylierten monocyclischen aromatischen Aminen wurden andere Verbindungen nur selten untersucht. In den 47 Studien in Tab. 2 wurden rund 40 aromatische Amine (incl. Isomere) in Urin oder Blut nachgewiesen, wovon allein 12 auf alkylierte Aniline entfielen.

Tabelle 2: Übersicht über die bislang im menschlichen Urin bzw. im Blut als Hämoglobin-Addukte nachgewiesenen primären aromatischen Amine

Verbindung	Quelle
Anilin	[54] ^{Hb} , [55] ^U , [56] ^{Hb} , [57] ^{U,Hb} , [58] ^{Hb,W} , [59] ^{U,Hb,W} , [60] ^U , [61] ^U , [62] ^{Hb}
Aminotoluole	[15] ^{U,W} , [54] ^{Hb} , [55] ^U , [56] ^{Hb} , [57] ^U , [58] ^{Hb,W} , [59] ^{U,Hb,W} , [61] ^U , [62] ^{Hb} , [63] ^{Hb} , [64] ^{Hb}
Dimethylaniline	[42] ^{Hb,L} , [43] ^{M,L} , [54] ^{Hb} , [56] ^{Hb} , [58] ^{Hb,W} , [62] ^{Hb} , [63] ^{Hb} , [65] ^{Hb}
Ethylaniline	[54] ^{Hb} , [56] ^{Hb} , [62] ^{Hb} , [63] ^{Hb} , [65] ^{Hb}
Polycyclische Amine	
Naphthylamine	[31] ^{Hb,W} , [40] ^U , [57] ^U , [58] ^{Hb,W} , [62] ^{Hb} , [63] ^{Hb} , [66] ^U , [67] ^{Hb}
Aminobiphenyle	[31] ^{Hb,W} , [40] ^U , [54] ^{Hb} , [56] ^{Hb} , [57] ^{U,Hb} , [58] ^{Hb,W} , [59] ^{U,Hb,W} , [62] ^{Hb} , [63] ^{Hb} , [64] ^{Hb} , [66] ^U , [67] ^{Hb} , [68] ^{Hb} , [69] ^{Hb} , [70] ^{Hb} , [71] ^{Hb} , [72] ^{Hb} , [73] ^{Hb} , [74] ^{Hb} , [75] ^{Hb} , [76] ^{Hb} , [77] ^{Hb} , [78] ^{Hb} , [79] ^{Hb}
andere	[31] ^{Hb,W} , [80] ^{Hb,W}
Chloraniline	[57] ^{U,Hb} , [61] ^U
Dichloraniline	[60] ^U , [61] ^U , [81] ^{U,W} , [82] ^U
Anisidine	[54] ^{Hb} , [56] ^{Hb} , [64] ^{Hb}
Nitroaniline	[80] ^{Hb,W} , [83] ^{Hb,W}
Diaminoaromaten	
Diaminotoluole	[23] ^{U,W} , [24] ^{U,W} , [25] ^{U,W} , [26] ^{U,W} , [57] ^U
Benzidin	[17] ^{U,W} , [57] ^U , [84] ^{Hb,W}
MDA	[19] ^{U,Hb,W} , [20] ^{U,Hb,W} , [21] ^{U,W}
MOCA	[18] ^{U,W} , [21] ^{U,W} , [22] ^{U,W} , [27] ^{U,Hb,W}
Diaminonaphthalin	[57] ^U

U im Urin, *M* in Muttermilch oder *Hb* als Hämoglobin-Addukt bestimmt, *W* berufsbedingter Kontakt mit aromatischen Aminen oder Produkten, die aromatische Amine freisetzen können, *L* nach Behandlung mit Lidocain.

4 Grundlagen der SPME

Die Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME) wurde Ende der 80er Jahre von PAWLISZYN *et al.* entwickelt [89, 90] und hat sich seitdem rasch etabliert, wie mehrere Bücher [91–93] und Übersichtsartikel [94–103] belegen. Die Extraktion beruht auf einer Gleichgewichtsverteilung zwischen der zumeist wässrigen Probe und einer polymeren stationären Phase. Diese ist auf eine 1 cm lange Glasfaser aufgebracht, die sich im Inneren einer modifizierten GC-Spritze befindet (vgl. Abb. 2). Bei dem kommerziell erhältlichen Modell ist der Kolben über einen Draht mit der Glasfaser verbunden.

Zur Extraktion wird mit der Nadel das Septum des Probengefäßes durchstoßen und die Glasfaser mit dem Kolben aus der schützenden Nadel ausgefahren. Während die Probe durch Rühren durchmischt wird, werden die Analyten in der Beschichtung angereichert. Für die Desorption wird die Glasfaser zurückgezogen, in den Injektor des Gaschromatographen gebracht und die Analyten nach dem Ausfahren der Faser thermodesorbiert. Ursprünglich für Gaschromatographie entwickelt, existieren mittlerweile auch Interfaces

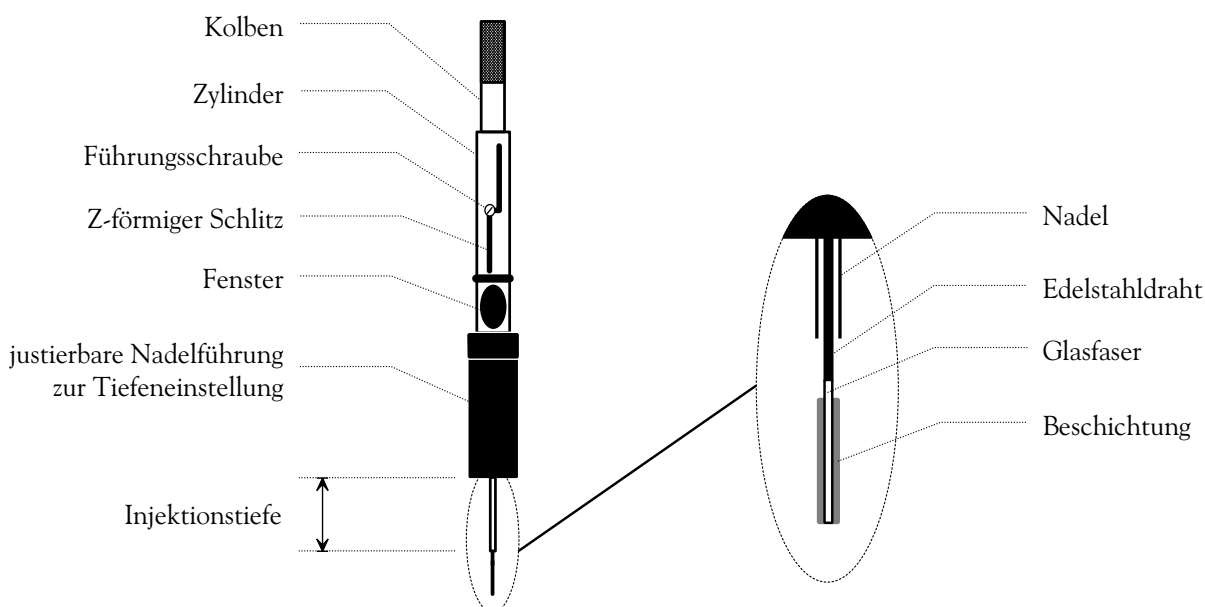


Abbildung 2: Aufbau der kommerziell erhältlichen SPME-Extraktionseinheit für manuelle Extraktion

für die Kopplung mit HPLC [104] und CE [105].

Das Verfahren eignet sich für die Extraktion fester, flüssiger und gasförmiger Proben. Neben der Extraktion direkt aus der Probe (direct-SPME), bietet sich die Möglichkeit, die Analyten auch aus der Gasphase zu extrahieren (Headspace-SPME) [106]. Durch Vermeidung des Kontaktes zwischen Probe und Faser wird eine Kontamination z.B. durch Proteine verhindert und die Lebensdauer der Faser deutlich gesteigert [107, 108]. Weiterhin wird die Selektivität verbessert, da so schwer flüchtige Substanzen abgetrennt werden. Im Gegensatz zur Headspace-Technik wird hier nicht nur ein Teil der Gasphase entnommen, es findet darüber hinaus eine Anreicherung in der Beschichtung statt.

Für die Festphasenmikroextraktion sind keine organischen Lösungsmittel erforderlich und die Durchführung ist einfach und schnell. In der beschriebenen Form ist es mobil und eignet sich für die Vor-Ort-Probenahme, kann umgekehrt aber auch leicht automatisiert werden. Da bei SPME die gesamte extrahierte Stoffmenge für die Analyse verwendet wird, ist sie effektiver als Flüssig-flüssig-Extraktion (liquid liquid extraction, LLE) oder Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE). Dadurch genügen viel kleinere Probenvolumina, biologische Proben werden zugänglich und Probenahme, Transport und Lagerung deutlich vereinfacht.

SPME hat in der Umweltanalytik, der Toxikologie und Forensik, bei der Analyse von Lebensmitteln und Naturstoffen Anwendung gefunden. Schwerpunkte bilden die Untersuchung von Pestiziden, BTEX, PAH's, VOC's, Aromastoffen, Pheromonen, Terpenen, Alkaloiden, Barbituraten und Amphetaminen [109]. Voraussetzung ist allerdings eine hinreichende Affinität der Analyten bezüglich der Faser. Polare Verbindungen mit $\log K_{OW} < 2$ werden nur noch unzureichend extrahiert und lassen sich nicht empfindlich bestimmen (vgl. Kapitel 5.1). Dies gilt entsprechend für Headspace-SPME, wobei zusätzlich ein hinreichend große HENRY-Konstante erforderlich ist.

Abhilfe soll hier SBSE (stir bar sorptive extraction) schaffen [110], eine Weiterentwicklung der SPME. Statt auf eine Glasfaser ist die Beschichtung auf einen Magnetstab aufgebracht. Dadurch ist das Extraktionsvolumen und entsprechend das Phasenverhältnis deutlich vergrößert, so dass insbesondere polare Verbindungen besser angereichert werden. Das Verfahren lässt sich jedoch nur teilweise automatisieren und verlangt einen

speziellen Thermodesorptions-Injektor. Bei in-tube SPME ist das Innere einer fused-silica Kapillare beschichtet [103]. Neben einem günstigen Phasenverhältnis, lässt sich dieses Verfahren leicht automatisieren und mit Flüssigchromatographie koppeln [111]. Bei SPDE (solid-phase dynamic extraction) ist das Polymer auf das Innere der Nadel einer GC-Spritze aufgebracht [112]. Die Beschichtung ist so besser geschützt, jedoch ist die Desorption der Analyten aus dem Inneren der Nadel schwieriger. Durch den besonders einfachen Aufbau besteht SDME (single drop microextraction) [113, 114]. Die Analyten werden in einen Lösungsmitteltropfen extrahiert, der an einer GC-Spritze hängend in die Probe eingebracht wird.

4.1 Theorie der Festphasenmikroextraktion

Die direkte Extraktion einer wässrigen Probe mit einer SPME-Faser wird gewöhnlich auf eine Verteilung zwischen zwei Phasen reduziert (vgl. Abb. 3a). Ausgegangen wird dabei von einem geschlossenen System, bei dem die Analyten in den beiden Phasen im Gleichgewicht vorliegen. Für den Verteilungskoeffizienten K_{fs} gilt

$$K_{fs} = \frac{c_f}{c_s} \quad (1)$$

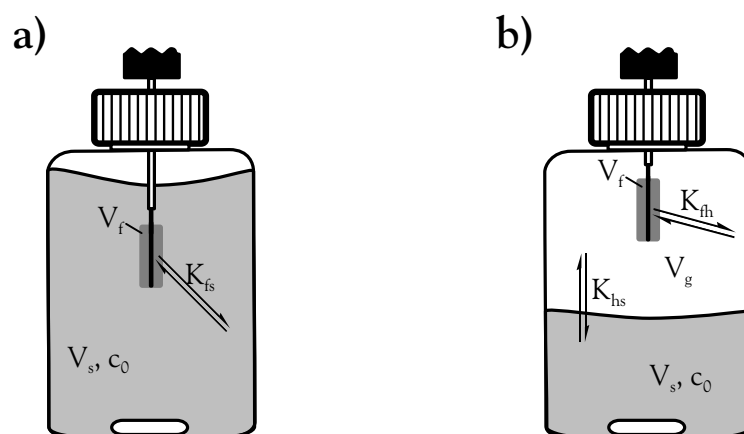


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Extraktion und der vorliegenden Gleichgewichte. Bei a) erfolgt die Extraktion direkt aus der Probe und b) aus dem Headspace

mit c_s , der Konzentration in der wässrigen Phase, und c_f , der Konzentration in der Faserbeschichtung. Durch Umformen mit $c = \frac{n}{V}$ gelangt man zu Gleichung (2). Die nach Erreichen des Gleichgewichts in der Probe verbleibende Stoffmenge n_s , wird dabei beschrieben als Differenz von Ausgangsstoffmenge c_0V_s und extrahierter Stoffmenge n_f .

$$K_{fs} = \frac{V_s n_f}{V_f n_s} = \frac{n_f V_s}{V_f (c_0 V_s - n_f)} \quad (2)$$

In Gleichung (2) sind das Probevolumen V_s und das Volumen der Beschichtung V_f bekannt. Nach Bestimmung der extrahierten Stoffmenge n_f kann bei bekannter Ausgangskonzentration c_0 der Verteilungskoeffizient K_{fs} berechnet werden. Dieser ist ein Maß für die Affinität des Analyten zur Faserbeschichtung. Da er unabhängig ist von der Filmdicke der Beschichtung, kann er zum Vergleich der unterschiedlichen Polymere herangezogen werden.

Durch Umstellen erhält man die extrahierte Stoffmenge n_f . Anhand von Gleichung (3) wird deutlich, dass die extrahierte Stoffmenge n_f proportional der Ausgangskonzentration c_0 ist. Dies ist elementare Voraussetzung für die Quantifizierung.

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f c_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (3)$$

Bei Headspace-SPME kommt eine weitere Phase hinzu (vgl. Abb. 3b). Die in der Probe enthaltene Substanzmenge verteilt sich hier zwischen wässriger Phase, Gasphase und Faserbeschichtung. Es gilt

$$c_0 V_s = c_f V_f + c_h V_h + c_s V_s \quad (4)$$

mit c_0 , der anfänglichen Analytkonzentration in der Probe mit dem Volumen V_s . Die Konzentrationen c_f , c_h und c_s beziehen sich auf die Faserbeschichtung, den Headspace bzw. die wässrige Probe mit den entsprechenden Volumina V_f , V_h und V_s . Neben dem Gleichgewicht zwischen Faser und Headspace $K_{fh} = \frac{c_f}{c_h}$ besteht darüber hinaus ein Gleichgewicht zwischen Headspace und wässriger Phase $K_{hs} = \frac{c_h}{c_s}$. Ersetzt man c_s und c_h durch die beiden letzteren Gleichungen, so gelangt man zu

$$n_f = \frac{K_{fh}K_{hs}V_fV_sc_0}{K_{fh}K_{hs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad (5)$$

Ebenso wie bei direkter Extraktion ist die Proportionalität zwischen Ausgangskonzentration c_0 und extrahierter Stoffmenge n_f gegeben. Da das Produkt der beiden Verteilungskoeffizienten K_{fh} und K_{hs} gleich dem Verteilungskoeffizienten K_{fs} ist, vereinfacht sich Gleichung (5) wie folgt:

$$n_f = \frac{K_{fs}V_fV_sc_0}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad (6)$$

Im Nenner treten die drei Phasen separat auf, wobei $K_{fs}V_f$ für die Kapazität der Faser, $K_{hs}V_h$ für die Kapazität des Headspace und V_s für die Kapazität der Probe steht. Tritt in einer Probe kein Headspace auf ($V_h = 0$), so geht Gleichung (6) in Gleichung (3) über. Unter Gleichgewichtsbedingungen spielt die Position der Faser, ob in der Probe oder im Headspace, für die extrahierte Stoffmenge keine Rolle.

Die Ausführungen für direkte wie Headspace-Extraktion sind streng nur für Fasern auf PDMS- bzw. PA-Basis gültig, bei denen die Extraktion ausschließlich auf Verteilung beruht (vgl Kapitel 4.3.1. Bei Fasern mit adsorptiven Eigenschaften gilt dieses Modell nur eingeschränkt, da eine Sättigung der Faseroberfläche zu einer Abweichung von der Proportionalität zwischen Analytkonzentration und extrahierter Stoffmenge führt. Bei Konzentrationen deutlich unterhalb der Sättigung gilt obiges Modell jedoch analog, vorausgesetzt die Extraktion wird nicht durch andere Analyten in hoher Konzentration gestört (kompetitive Effekte).

Für die Kinetik der Festphasenmikroextraktion ist es notwendig, den Massentransport in der Probe zu beschreiben. Wird die Probe bei direkter SPME (vgl. Abb. 3a) gerührt, so kann die Konzentration in der Lösung aufgrund der Konvektion als konstant angenommen werden [115]. Eine Ausnahme bildet die Schicht unmittelbar um die Faser. Unabhängig von der Durchmischung ruht die Flüssigkeit an der Phasengrenze. Der Massentransport durch diese Grenzschicht beruht ausschließlich auf Diffusion und lässt sich nach Gleichung (7) mit Hilfe des 2. FICKSchen Gesetzes beschreiben, das die zeitliche Änderung der Konzentration in Abhängigkeit vom Diffusionskoeffizienten D beschreibt.

Die Dicke dieser Grenzschicht und damit die Diffusion hängt maßgeblich von der Durchmischung ab.

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} \quad (7)$$

Die stärkste Anreicherung erfolgt zu Beginn der Extraktion, da der Konzentrationsunterschied zwischen Faser und Probe maximal ist. Im Laufe der Extraktion nimmt dieser ab und gemäß dem 1. FICKSchen Gesetz auch der Massenfluss J

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (8)$$

Die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts nimmt folglich mit anwachsendem Diffusionskoeffizienten ab. Da die Analyten auch in das Innere der Beschichtung diffundieren, hängt die Äquilibrationszeit auch von der Dicke der Beschichtung ab. Bei Analyten mit kleinen Verteilungskoeffizienten K_{fs} erfolgt die Äquilibration schneller, da der Massentransport geringer ist.

Bei Extraktion aus dem Headpace (vgl. Abb. 3b) kann die Diffusionsgrenzschicht zwischen Faser und Gasphase vernachlässigt werden, da die Diffusionskoeffizienten in Gasen um 3-5 Größenordnungen als in Flüssigkeiten größer sind [106]. Aus diesem Grunde sind die Äquilibrationszeiten verglichen mit direct-SPME meist geringer. Durch die rasche Diffusion in der Gasphase entsteht an der Phasengrenze flüssig/Gas ein Konzentrationsgradient. Aufgrund fehlender Konvektion an der Phasengrenze lässt sich dieser wie oben mit einer Diffusionsgrenzschicht beschreiben, deren Dicke ebenfalls entscheidend von der Durchmischung der Probe abhängt. Angesichts der unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten wird der Phasenübergang zwischen der wässrigen Probe und dem Headpace häufig geschwindigkeitsbestimmend. Dies gilt besonders für Analyten mit geringen HENRY-Konstanten: Da die Konzentration der Analyten in der Gasphase niedrig ist, sind auch die Konzentrationsunterschiede nur gering. Demzufolge ist der Fluss gemäß Gleichung (8) gering und die Äquilibration erfolgt trotz großer Diffusionskoeffizienten nur langsam.

4.2 SPME für Verteilungsprozesse

SPME ist aufgrund des geringen Probenbedarfs interessant für die Untersuchung von Verteilungsprozessen, die bei zahlreichen pharmazeutischen und ökotoxikologischen Prozessen eine Rolle spielen. Durch die Bindung von Analyten an Matrixbestandteile ändern sich deren Eigenschaften und es tritt eine Diskrepanz zwischen nomineller und bioverfügbarer Konzentration auf. Beispielsweise verändert die Bindung an Matrixbestandteile das Verhalten hinsichtlich der Mobilität in wässrigen Medien, biologischer Aufnahme und Verteilung gegenüber Sedimenten [116, 117]. Diese Unterscheidung zwischen freigelösten Analyten und gebundenen Verbindungen ist ein grundlegendes Prinzip in der Toxikologie, da nur letztere als biologisch aktiv angesehen werden [118]. Die Bestimmung der bioverfügbaren Konzentration erfolgt gewöhnlich durch Gleichgewichtsdialyse, Mikro-dialyse, Ultrafiltration oder Gelfiltration [119], jedoch ist die Probenvorbereitung, die für therapeutische Konzentrationen erforderlich ist, aufwendig. Demgegenüber ist SPME effizienter, da die gesamte extrahierte Stoffmenge für die Analyse verwendet wird.

Durch das Prinzip der geringfügigen Abreicherung (negligible depletion SPME, nd-SPME) kann auch SPME für die Bestimmung der frei verfügbaren Konzentration herangezogen werden, sofern durch die Extraktion die Analytkonzentration nicht signifikant verändert wird [120]. Demzufolge kann angenommen werden, dass das Gleichgewicht zwischen gebundenen und gelösten Analyten durch die Festphasenmikroextraktion nicht gestört wird. Durch Vergleich von Standard und Matrixprobe wurde nd-SPME zur Bestimmung von Protein/Wasser- [120, 121], Gewebe/Blut-[122], Membran/Wasser- [123, 124] und DOC/Wasser-Verteilungskoeffizienten [116, 117, 125] herangezogen. Darüber hinaus sind so auch Informationen über die Bindungsverhältnisse und die Gleichgewichtskonstanten zugänglich [126, 127]. Mit der biomimetischen Extraktion wird die SPME zur Beurteilung der Ökotoxizität und Risikobewertung von Schadstoffen benutzt. Dazu wird die Festphasenmikroextraktion stellvertretend für Lipide bei der Verteilung organischer Verbindungen eingesetzt [128–130].

Für die Simulation der Verteilung und des Verbleibs von Verbindungen in der Umwelt [131] bedarf es ebenso eines quantitativen Maßes für die Polarität wie für die Abschätzung der Bioakkumulation [132, 133] oder die Abschätzung der Toxizität [134].

Gewöhnlich wird hierfür der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient K_{OW} verwendet. Als Alternative zu shake-flask-, slow-stirring- und HPLC-Methoden konnte auch SPME zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten eingesetzt werden [135–137]. Die direkte Korrelation zu $\log K_{OW}$ -Werten ist aber auf strukturell eng verwandte Verbindungen beschränkt [130, 138–140].

Bei der Bestimmung der extrahierten absoluten Stoffmenge n_f behilft man sich, in dem man das chromatographische System mit Flüssiginjektion kalibriert. Der Nachteil dieser Vorgehensweise besteht in der unterschiedlichen Probenaufgabe: Während SPME lösungsmittelfrei ist, spielt die Verdampfung des Lösungsmittels bei Flüssiginjektion eine große Rolle [141, 142]. In Anbetracht des großen Dampfolumens wird die Injektion maßgeblich durch die Art des Insert-Liners in Verbindung mit den Flussparametern, Injektortemperatur, Split etc. beeinflusst. Darüber hinaus muss das Lösungsmittel auch beim Transfer zur chromatographischen Säule und der Refokussierung (Solvent-Effekt) berücksichtigt werden. Dagegen genügt bei SPME ein dünner Liner mit 0,75 mm ID. Der Vergleich von SPME und Flüssiginjektion ist also nur möglich, wenn in beiden Fällen gleiche Anteile der aufgegebenen Stoffmenge auf die chromatographische Säule transferiert werden, und wurde deshalb mehrfach angezweifelt [143, 144].

Alternativ lässt sich die extrahierte Stoffmenge n_f durch mehrfache Extraktion einer Probe bestimmen. Die exponentielle Abnahme der Konzentration in der Probe wurde bereits 1992 von ARTHUR *et al.* beschrieben [145]. Wird die Probe unendlich oft extrahiert, so entspricht die Summe über alle Peakflächen der anfänglich enthaltenen Stoffmenge $n_{s,0}$. Mit Kenntnis der Ausgangsstoffmenge erhält man den erforderlichen Zusammenhang zwischen Peakfläche und aufgebener Stoffmenge, so dass für jeden Teilschritt x die extrahierte Menge $n_{f,x}$ bestimmt werden kann. URRUTY *et al.* wendeten dieses Prinzip zur Bestimmung der absolut extrahierten Stoffmenge für 3 Pestizide an [143]. NARDI übertrug es auf in-tube SPME und konnte so die Verteilungskoeffizienten von BTEX bestimmen [146].

Anstelle der Verteilungskoeffizienten K liefern die Extraktionsraten E ein nützliches und anschauliches Maß, um die Effizienz der SPME zu beurteilen, da sie den prozentualen Anteil der Stoffmenge angibt, die zur Analyse verwendet wird. Die Extraktionsraten E

sind definiert als der Anteil der extrahierten $n_{f,x}$ zur zuvor in der Probe vorhandenen Stoffmenge $n_{s,x-1}$

$$E = \frac{n_{f,x}}{n_{s,x-1}} \quad (9)$$

mit der Analytmenge in der Probe vor der Extraktion $n_{s,x-1}$ und in der Faser nach der Extraktion $n_{f,x}$. Da die Volumenverhältnisse als konstant angesehen werden können, wurden Stoffmengen statt Konzentrationen verwendet. Im Gegensatz zu den Verteilungskoeffizienten sind die Extraktionsraten nicht nur für Gleichgewichtsbedingungen definiert.

Nach der ersten Extraktion verbleibt in der Probe die Stoffmenge $n_{s,1}$, die gegenüber der Ausgangsstoffmenge $n_{s,0}$ um den extrahierten Teil verringert ist (Gleichung (10)). Letzterer ist gemäß Gleichung (9) proportional zur anfänglich enthaltenen Stoffmenge.

$$n_{s,1} = n_{s,0} - n_{f,1} = n_{s,0} - E \cdot n_{s,0} = n_{s,0} \cdot (1 - E) \quad (10)$$

Wird die Probe nach Desorption der Analyten von der Faser erneut extrahiert, kann der verbleibende Teil in der Lösung analog der obigen Überlegungen unter Einbeziehung der Gleichungen (9) und (10) hergeleitet werden.

$$\begin{aligned} n_{s,2} &= n_{s,1} - n_{f,2} = n_{s,1} - E \cdot n_{s,1} \\ &= n_{s,0} \cdot (1 - E) - n_{s,0} \cdot E \cdot (1 - E) = n_{s,0} \cdot (1 - E)^2 \end{aligned} \quad (11)$$

Die hier zugrunde liegende geometrische Reihe ist leicht erkennbar und lässt sich anhand der Gleichungen (10) und (11) für x Extraktionen wie folgt formulieren:

$$n_{s,x} = n_{s,0} \cdot (1 - E)^x \quad (12)$$

Mit Gleichung (12) kann die Stoffmenge in der Lösung $n_{s,x}$ als Funktion der Zahl an Extraktionsschritten wiedergegeben werden. Da die extrahierte Stoffmenge die Differenz der gelösten Analytmengen zweier aufeinander folgender Extraktionen bildet, lässt sich der Zusammenhang für $n_{f,x}$ folgendermaßen ausdrücken:

$$\begin{aligned}
n_{f,x} &= n_{s,x-1} - n_{s,x} = n_{s,0} \cdot (1 - E)^{x-1} - n_{s,0} \cdot (1 - E)^x \\
&= n_{s,0} \cdot E \cdot (1 - E)^{x-1}
\end{aligned} \tag{13}$$

Trägt man die Peakflächen eines depletion-SPME Experiments als Funktion der Zahl an Extraktionsschritten auf, zeigt die Kurve die erwähnte exponentielle Abnahme und lässt sich gemäß Gleichung (13) mit $f(x) = ab^x$ und $a = n_{s,0} \cdot E$, $b = 1 - E$ beschreiben. Da die aufgegebene Stoffmenge proportional zur Peakfläche ist, kann anhand der Steigung b die Extraktionsrate E berechnet werden. Gemäß Gleichung (9) kann daraus bei Kenntnis der anfänglich enthaltenen Stoffmenge $n_{s,0}$ die extrahierte Stoffmenge $n_{f,1}$ bestimmt werden. Diese Art der Auftragung erschwert die Interpretation der Ergebnisse und stellt höhere Ansprüche an die zu verwendende Software. Durch Logarithmieren der Peakflächen kann die Auswertung deutlich vereinfacht werden. Auf diese Weise erhält man bei Auftragung der logarithmischen Peakflächen gegen die Zahl an Extraktionen eine Gerade (vgl. Abb. 17b).

$$\log n_{f,x} = \log(n_{s,0} \cdot E) + (x - 1) \cdot \log(1 - E) \tag{14}$$

4.3 Extraktionsparameter

4.3.1 Beschichtung

Für die SPME stehen derzeit sieben kommerziell erhältliche Beschichtungen zur Verfügung. Die verschiedenen Fasern sind in Tab. 3 nach zunehmender Polarität aufgelistet [101], wobei es zu Überschneidungen kommt. Zudem sind die Fasern in unterschiedlichen Filmdicken erhältlich. Mit abnehmender Filmdicke verkürzen sich die Äquilibrierungszeiten ebenso wie die extrahierten Stoffmengen, da die Analyten auch in die Faser diffundieren.

Den vielleicht wichtigsten Unterschied bildet der Extraktionsmechanismus: Bei PA und PDMS besteht die Beschichtung aus einem hochviskosen Flüssigkeitsfilm und die

Tabelle 3: Übersicht über die erhältlichen SPME-Fasern geordnet nach zunehmender Polarität gemäß KATAOKA [101]

Faserbeschichtung	Abkürzung	Filmdicke / μm	
Polydimethylsiloxan	PDMS	7	<i>a,d</i>
		30	<i>a,d</i>
		100	<i>a,d</i>
Carboxen-Polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	75	<i>b</i>
		85	<i>c</i>
Divinylbenzen-Carboxen-Polydimethylsiloxan	DVB/CAR/PDMS	50/30	<i>c</i>
Polyacrylat	PA	85	<i>b,d</i>
Polydimethylsiloxan-Divinylbenzen	PDMS/DVB	65	<i>b,d</i>
		65	<i>c</i>
Carbowax-Divinylbenzen	CW/DVB	65	<i>b</i>
		70	<i>c</i>
Carbowax-Templated Resin	CW/TPR	50	<i>b,e</i>

a ungebunden; *b* teilweise vernetzt; *c* hochgradig vernetzt, Stable-Flex-Faser; *d* auch für HPLC geeignet; *e* ausschließlich für HPLC geeignet.

Extraktion beruht maßgeblich auf Verteilung. Dementsprechend gilt hier für direct-SPME der Grundsatz „*similia similibus solventur*“. Im Gegensatz dazu sind bei den übrigen Fasern poröse DVB- bzw. Carboxen-Partikel mittels PDMS oder CW auf den Glasfaserkern aufgebracht. Beide Materialien verfügen über eine sehr große Oberfläche (Carboxen 1006: $715 \text{ m}^2/\text{g}$, DVB: $750 \text{ m}^2/\text{g}$ [92]). Neben der Verteilung spielen hier demzufolge adsorptive Effekte eine große Rolle. Die Adsorption wurde bei SPME bislang wenig berücksichtigt. 1999 erschien die erste Arbeit, in der GÓRECKI *et al.* auf adsorptive Effekte hinwies [147]. Im Gegensatz zu den reinen Verteilungsphasen muss hier die begrenzte Zahl der Sorptionsplätze berücksichtigt werden. Demzufolge ist bei hohen Konzentrationen eine Abweichung von der Proportionalität zwischen extrahierter

Stoffmenge und Ausgangskonzentration zu beobachten [147]. Darüber hinaus kann es besonders bei langen Extraktionszeiten zu kompetitiven Effekten zwischen den Analyten kommen, bei denen Verbindungen mit geringer Affinität zur Faser verdrängt werden [148].

Zudem gibt es Unterschiede bei der Art der Immobilisierung der Beschichtung: Die ungebundenen stationären Phasen sind in polaren Lösungsmitteln stabil, können aber in unpolaren organischen Lösungsmitteln anschwellen. Durch chemische Vernetzung der Beschichtung (Cross-Linking) nimmt die Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln zu. Dies gilt insbesondere für Stable-flex-Fasern, bei denen eine hochgradige Vernetzung durchgeführt und die Beschichtung zudem chemisch an den Glasfaserkern gebunden wurde. Darüber hinaus eignen sich einige Fasern nicht für die Thermo-desorption im GC-Injektor: So enthält die CW/TPR-Beschichtung Kunstharze, die nicht hitzebeständig sind. KELZ beschreibt weiterhin die Einlagerung von Wasser in die CW/DVB-Beschichtung [149]. Bei der Desorption im heißen Injektor führt die explosionsartige Verdampfung des eingelagerten Wassers zur Zerstörung der Faser.

4.3.2 Durchmischung der Probe

Da sich die Analyten besonders bei direkter Extraktion in der Umgebung der Faser abreichern, ist es erforderlich, die Probe reproduzierbar zu durchmischen. Üblicherweise erfolgt dies durch Rühren mit einem Magnetrührer, das bei hohen Rührgeschwindigkeiten zu einer sehr guten Durchmischung der Probe führt. Die quantitative Analyse setzt voraus, dass die Rührgeschwindigkeit konstant und reproduzierbar ist. Da die Strömungsgeschwindigkeit in der Probe ortsabhängig ist und vom Rand zur Mitte ein Maximum durchläuft, ist eine immer gleiche, reproduzierbare Position der Faser in der Probe wichtig. Die Rührfische müssen nach jeder Verwendung sorgfältig gereinigt werden, um eine Verschleppung der Analyten zu verhindern [150]. So konnte von ACKERMAN *et al.* gezeigt werden, dass besonders unpolare Verbindungen vom Rührfisch sorbiert werden [151]. Die Beschichtung des Rührfisches tritt damit in Konkurrenz zur Faserbeschichtung und vermindert die extrahierte Stoffmenge.

MOTLAGH *et al.* konnten in einem Vergleich zeigen, dass die Verwendung von Ultraschall gegenüber magnetischem Rühren zu den besseren Resultaten führt [152]. Von Nachteil ist neben der Erwärmung der Probe infolge der Energiezufuhr die starke Belastung der Faser bei direct-SPME. Dies gilt auch für die Agitation [153], bei der die Faser mechanisch zur Vibration angeregt wird. Da ähnlich effizient wie Rühren [91], wird die Agitation bei den Autosamplern von Varian und CTC eingesetzt. Deutlich weniger belastet wird die Faser bei der von GEPPERT entwickelten Extraktion, bei der die Probe durch Rotation der Faser durchmischt wird [154].

Auch bei Headspace-SPME ist Rühren von Vorteil, da der Übergang von der wässrigen in die Gasphase geschwindigkeitsbestimmend ist und sich die Analyten an der Phasengrenze abreichern. Durch intensive Durchmischung wird die Dicke der Grenzschicht verringert und die Einstellung des Gleichgewichts beschleunigt.

4.3.3 Zusammensetzung der Probe

Die extrahierte Stoffmenge wird auch durch die Zusammensetzung der Probe beeinflusst. Ebenso wie bei der Flüssig-flüssig-Extraktion, kann durch Zugabe von Salz zu der Probe ein Aussalzeffekt erreicht werden, bei dem der Verteilungskoeffizient K_{fs} zunimmt. Neben dem Salz und dessen Konzentration hängt der Effekt aber auch entscheidend vom Analyten ab und kann gleichfalls zu einer Verkleinerung der Verteilungskoeffizienten führen (Einsalzeffekt) [149]. Der Aussalzeffekt wird angesichts des Aufwandes, der mit der präzisen Einwaage des Salzes für jede einzelne Probe verbunden ist, nur bei Analyten angewandt, die in geringem Maße extrahiert werden. Um einen entscheidenden Einfluss auf die extrahierte Stoffmenge zu erzielen, sind hohe Salzkonzentrationen (>10 %) erforderlich, die bei direkter Extraktion zu einer verringerten Haltbarkeit der Faser und zu Ablagerungen im Injektor des Gaschromatographen führen können [155].

Andererseits wird die Quantifizierung durch eine wechselnde Probenzusammensetzung erschwert. Dies gilt besonders für Proben, deren Salzgehalt starken Schwankungen unterworfen ist. Dieser störende Einfluss lässt sich durch Zugabe großer Salzmengen überdecken.

Der pH-Wert der Probe ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Zum einen ist nur die Extraktion ungeladener Substanzen möglich. Deshalb muss der pH-Wert vor der Extraktion durch Zugabe von Säuren bzw. Laugen eingestellt und mit Puffern gegen Schwankungen stabilisiert werden. Für optimale Bedingungen sollte der pH-Wert für saure/basische Analyten zwei Einheiten unter bzw. über dem pK_s -Wert liegen.

Für die direkte Extraktion ist darüber hinaus zu beachten, dass die SPME-Fasern laut Hersteller nur in einem pH-Bereich von pH 2 bis 11 beständig sind. Da die Fasern bei Headspace-SPME nicht mit der Probe in Kontakt kommen, kann bei entsprechenden Analyten die Extraktion aus der Gasphase Abhilfe schaffen.

Durch die Zugabe organischer Lösungsmittel ändert sich die Polarität der Probe. Dadurch wird die Löslichkeit der Analyten in der wässrigen Probe verbessert und ihre Extrahierbarkeit zumeist drastisch verringert. Weiterhin werden Lösungsmittel in die polymere Beschichtung eingelagert, wodurch diese quillt und Schaden nimmt. Bei der Extraktion aus dem Headspace können durch flüchtige Lösungsmittel Sorptionstellen an der Polymeroberfläche gesättigt und die Analyten diskriminiert werden. Es wird deshalb empfohlen, den Lösungsmittelanteil unter 1 % (V/V) zu halten [91].

4.3.4 Probevolumen

Die extrahierte Stoffmenge ist bei direkter Extraktion gemäß Gleichung (3) abhängig vom Probevolumen. Erst bei hinreichend großen Volumina gilt $V_s \gg K_{fs} V_f$ und die extrahierte Stoffmenge wird unabhängig vom Probevolumen:

$$n_f = K_{fs} V_f c_0 \quad (15)$$

Große Probevolumina minimieren zudem die Sorption der Analyten an den Glaswänden, da das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche größer ist [156].

Ähnliches gilt für Headspace-SPME, wo das Volumen der Gasphase nur im Nenner von Gleichung 6 auftritt. Eine Verkleinerung des Headspace führt deshalb zu einer Vergrößerung der extrahierten Stoffmenge. Weiterhin hat das Headspace-Volumen auch

einen Einfluss auf die Kinetik [157]: Bei großen Headspace-Volumina erfolgt die Extraktion fast ausschließlich aus der Gasphase. Während die Empfindlichkeit abnimmt, erfolgt die Äquilibration angesichts hoher Diffusionskoeffizienten in der Gasphase deutlich rascher. Andererseits führt bei Analyten mit geringen HENRY-Konstanten ein großes Headspace-Volumen zu langen Äquilibrationszeiten, da angesichts geringer Konzentrationunterschiede in der Gasphase viel Zeit für das Passieren gebraucht wird.

Darüber hinaus unterliegt die Wahl des Probevolumens immer auch instrumentellen Einschränkungen. So erfordert das intensive Rühren bei Headspace-SPME eine ausreichend große Gasphase, um eine Benetzung der Faser zu vermeiden. Weiterhin werden die Möglichkeiten durch das verfügbare Volumen an Probenmaterial sowie durch apparative Gegebenheiten limitiert, die häufig nur die Verwendung bestimmter Vials zulassen.

4.3.5 Extraktionszeit

Die extrahierte Stoffmenge nimmt mit der Extraktionszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts zu. Unter Berücksichtigung eines experimentellen Fehlers von 5 % gilt das Gleichgewicht als erreicht, wenn 95 % der maximalen Stoffmenge $n = 0,95n_{eq}$ extrahiert sind. Die Äquilibrationszeiten bewegen sich dabei im Bereich von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden. Gleichung (16) gibt die Zunahme der extrahierten Stoffmenge n als Funktion der Extraktionszeit t wieder

$$n = n_{eq}(1 - e^{-at}) \quad (16)$$

mit der extrahierten Stoffmenge im Gleichgewicht n_{eq} und der analytspezifischen Konstante a .

Gleichung (16) wurde darüber hinaus von AI dazu benutzt, um Äquilibrationszeiten zu extrapolieren [158]. Anhand mehrerer Extraktionen mit unterschiedlicher Extraktionszeit lassen sich so auch lange Äquilibrationszeiten leicht bestimmen.

Während sich die extrahierte Stoffmenge generell anfangs mit der Extraktionszeit stark ändert, verliert der Einfluss der Extraktionszeit bis zum Gleichgewicht zunehmend an

Bedeutung (vgl. Gleichung (7)). Besonders bei manueller SPME empfiehlt sich deshalb eine Extraktion unter Gleichgewichtsbedingungen, da so Fehler bei der Extraktionszeit und der Durchmischung der Probe weniger zum Tragen kommen. Bei Einhaltung exakt gleicher Extraktionszeiten kann SPME auch vor Erreichen des Gleichgewichts für eine quantitative Analyse verwendet werden, da die extrahierte Stoffmenge zu jedem Zeitpunkt der Ausgangskonzentration proportional ist. In diesem Fall lassen sich Schwankungen durch Verwendung eines Autosamplers oder eines geeigneten Internen Standards minimieren.

4.3.6 Extraktionstemperatur

Der Einfluss der Temperatur auf den Verteilungskoeffizienten zwischen Beschichtung und umgebender wässriger bzw. gasförmiger Probe lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$K = K_0 \cdot e^{-\frac{\Delta H}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0})} \quad (17)$$

Die Verteilungskoeffizienten K_0 bzw. K beziehen sich auf die Ausgangstemperatur T_0 bzw. auf die geänderte Temperatur T , ΔH ist die Enthalpieänderung bei Extraktion und R die Gaskonstante. Da die Extraktion stets ein exothermer Vorgang ist ($\Delta H < 0$), führt Temperaturerhöhung zu einem negativen Exponenten in Gleichung (17) und damit zu einem kleineren Verteilungskoeffizienten. Dieser Zusammenhang gilt sowohl für direkte Extraktion wie Headspace-SPME.

Bei Extraktion aus dem Headspace kommt hinzu, dass die HENRY-Konstante der Verbindung und somit der Verteilungskoeffizient K_{hs} gemäß Gleichung (18) mit der Temperatur zunimmt. Dabei sind p und p_0 die Dampfdrucke bei ursprünglicher T_0 bzw. geänderter Temperatur T und ΔH_{Verd} die Verdampfungsenthalpie ($\Delta H_{Verd} > 0$). Beide Einflüsse zusammen führen zu einem Temperaturoptimum außerhalb dessen der Verteilungskoeffizient K_{fs} abnimmt. Da der Dampfdruck exponentiell mit der Temperatur zunimmt, ist es besonders bei Headspace-SPME wichtig, die Probe möglichst exakt zu thermostatisieren.

$$p = p_0 \cdot e^{-\frac{\Delta H_{Verd}}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0})} \quad (18)$$

Darüber hinaus führt eine Temperaturerhöhung zu einer Abnahme der Viskosität der Probe. Dadurch nehmen die Diffusionskoeffizienten zu und die Gleichgewichtseinstellung erfolgt rascher (vgl. Kap. 4.1 ab Seite 11). Die Temperaturerhöhung ist sinnvoll bei Analyten mit großen Verteilungskoeffizienten und langen Äquilibrierungszeiten, die auf diese Weise - allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit - verkürzt werden können. Der Effekt ist besonders ausgeprägt bei Extraktion aus dem Headspace, da mit der Temperatur die Analytkonzentration in der Gasphase zunimmt, so dass die Extraktion nahezu ohne Beteiligung der wässrigen Probe erfolgen kann.

Da der Wärmetransfer im Headspace nur langsam erfolgt, nimmt die SPME-Faser nur allmählich die Temperatur der Probe an. Aus diesem Grunde kann die extrahierte Stoffmenge während der Extraktion mit langsam ansteigender Fasertemperatur und damit abnehmenden Verteilungskoeffizienten auch zurückgehen [159].

4.3.7 Desorptionsbedingungen

Die Desorption der Analyten erfolgt im heißen Injektor des Gaschromatographen. Dazu wird die Faser rasch ausgefahren, um eine Desorption in der Nadel zu verhindern. Für optimale chromatographische Bedingungen (geringe Bandenverbreiterung) sollen die Analyten möglichst rasch von der Faser auf die Säule transferiert werden. Durch eine hohe Injektortemperatur wird der Vorgang infolge rascherer Diffusion begünstigt. Hierbei muss neben der empfohlenen Höchsttemperatur der Faser auch die Thermostabilität der Analyten berücksichtigt werden. Durch die Verwendung eines PTV-Programms wird die explosionsartige Verdampfung von eingelagertem Wasser und damit eine rasche Zerstörung der Faser verhindert. Da die Temperatur im Injektor nicht an jeder Stelle gleich ist, muss die Faser im Injektor exakt und reproduzierbar positioniert werden. Zur Ermittlung der optimalen Desorptionsbedingungen wird die Injektionstiefe variiert.

Im Gegensatz zur Flüssiginjektion, bei der die Ausdehnung des verdampfenden Lösungs-

mittels berücksichtigt werden muss, genügt bei SPME ein Insert-Liner mit geringem Innendurchmesser (üblicherweise 0,75 mm). Dadurch werden die Analyten weniger verteilt und rascher auf die Säule transferiert. Dies wird durch die infolge des dünnen Insert-Liners hohe lineare Strömungsgeschwindigkeit unterstützt.

Obwohl nach Berechnungen eine vollständige Desorption innerhalb weniger Sekunden erfolgt [91], empfiehlt es sich, die Faser mehrere Minuten im Injektor zu belassen, damit eine Verschleppung der Analyten ausgeschlossen werden kann. Zudem können so schwerflüchtige Matrixbestandteile besser desorbiert werden. Andererseits verkürzt das lange Belassen der Faser im Injektor deren Lebensdauer.

Während der Desorption empfiehlt sich eine möglichst geringe Ofentemperatur, um eine optimale Refokussierung der Analyten zu gewährleisten. Nach dem Transfer der Analyten auf die Säule wird das Trennprogramm gestartet und durch Öffnen des Split-Ventils verhindert, dass schwerflüchtige Matrixbestandteile auf die Säule gelangen.

5 Stand der Forschung

5.1 Extraktion aromatischer Amine

Die Extraktion dient neben der Abtrennung von Matrixbestandteilen der Aufkonzentrierung des Probenmaterials. Die polaren aromatischen Amine lassen sich aufgrund der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken nur schwer aus wässrigen Proben extrahieren. Zudem liegen die Verbindungen in Abhängigkeit des pH-Wertes teilweise ionisiert vor.

Die Flüssig-flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction, LLE) wird nach wie vor aufgrund der einfachen Durchführung und des geringen apparativen Aufwandes häufig eingesetzt. Bei der Extraktion von halogenierten, alkylierten und nitrierten Anilinen lassen sich so gute Wiederfindungsraten erzielen [82, 160–165]. Der Verbrauch an organischen Lösungsmitteln ist jedoch sehr hoch und besonders bei stark matrixbelasteten Proben können Emulsionen auftreten. Zudem können bei der Aufkonzentrierung der organischen Phase Verluste auftreten [162]. Für die polareren Diaminoverbindungen wurden von OOSTDYK *et al.* Wiederfindungsraten unter 20 % beschrieben [166], die sich nur unter Verwendung großer Mengen Dichlormethan [167] bzw. kontinuierlicher Extraktion verbessern lassen [168].

Mittels Membranextraktion lassen sich alkylierte und halogenierte Aniline anreichern [169, 170]. Bei dieser Methode dient die Membran als Interface zwischen Donor- und Akzeptorphase, durch das die Analyten aufgrund eines pH-Gradienten diffundieren. Alternativ kann die Diffusion auch durch eine poröse Membran in eine organische Phase erfolgen [171–173]. Auf diese Weise treten keine Emulsionen auf, das Verfahren lässt sich leicht automatisieren und eignet sich für eine kontinuierliche Messung.

Bei der Extraktion von Chlor- und Methylanilinen mit Festphasenextraktion wurden durchweg sehr gute Wiederfindungsraten und Durchbruchsvolumina berichtet. Dabei kamen als Sorbentien sowohl PS/DVB-Polymere [164, 168, 174–186], C₁₈- [165, 166, 187–190] als auch Ionenaustauschermaterialien [187, 191, 192], Immunosorbentien [193] und graphitierter Kohlenstoff [194, 195] zum Einsatz. Für Diamino-Verbindungen wurden

mit PS/DVB-Polymeren angesichts höherer Kapazität und Affinität verglichen mit C₁₈-Materialien bessere Ergebnisse erzielt [166]. Innerhalb der PS/DVB-Polymere konnten mit den hochgradig vernetzten Materialien (Oberfläche von ca. 1000 m²/g) für die polaren Analyten wie Anilin und Nitroanilin deutlich bessere Wiederfindungsraten und Durchbruchsvolumina erzielt werden als mit Polymeren geringerer Oberfläche [196]. Mit ersteren ist sogar eine Extraktion bei pH 2 ohne signifikant schlechtere Wiederfindungsraten möglich [182]. Mit diesen Materialien lassen sich auch Diaminotoluole anreichern [168]. Interessanter Weise konnten mit funktionalisierten Polymeren trotz einer vergleichsweise geringen Oberfläche (< 100 m²/g) auch bei diesen Analyten exzellente Wiederfindungsraten erzielt werden [178]. Bei Verwendung von β -Cyclodextrin-Polyurethan-Polymeren wurden für Benzidine, 2-Naphthylamin und 4-Aminobiphenyl bessere Wiederfindungsraten beschrieben als für die kleineren monocyclischen aromatischen Amine [197], da die Hohlräume bei diesen für optimale Wechselwirkungen zu groß sind. Gute Ergebnisse wurden auch mit Ionenaustauschern erreicht [191], jedoch führen angesichts der geringen Kapazität des Austauschermaterials bei Realproben insbesondere anorganische Ionen zu einer raschen Überladung [167, 192]. BOUZIGE *et al.* beschreiben eine verbesserte Matrixabtrennung bei Verwendung eines Immunosorbents, dessen Eignung stark vom Analyten abhing [193]. Insgesamt sind bei LLE wie SPE große Probenvolumina erforderlich, die Probenahme, Transport, Lagerung und Probenvorbereitung aufwendig gestalten.

Die erwähnten Nachteile können durch miniaturisierte Verfahren wie mLLE [198–200], in-vial LLE [201], on-line SPE [177, 183, 196, 202, 203] und SPME [43, 107, 204–220] vermieden werden. Während mLLE und in-vial LLE ein vergleichsweise kleines Aliquot des Extrakts verwenden, wird bei online-SPE und SPME die gesamte extrahierte Stoffmenge injiziert. Dadurch sind sie effizienter, so dass weit geringere Probenvolumina genügen. Der Probendurchsatz ist höher, da sich diese Verfahren leicht automatisieren lassen.

Die on-line SPE wurde erfolgreich zur Bestimmung von Chlor-, Methyl- und Nitroanilinen sowie Benzidinen eingesetzt [177, 183, 196, 202, 203]. LESS nennt für diese Analyten bei Anreicherung von 50 mL wässriger Probe Wiederfindungsraten zwischen 64 und 101 % [177]. Unter Verwendung von HRP-Festphasen liegen die Durchbruchsvolumina

über 300 mL. Lediglich 2,6DAT bricht bereits bei weniger als 25 mL durch. Im Gegensatz zur offline-SPE, für die LESS unter Verwendung des gleichen Materials Durchbruchsvolumina von über 500 mL nennt, ist bei on-line SPE die Kapazität deutlich geringer. Ähnliche Probleme mit polaren Analyten treten auch bei mLLE und SPME auf.

Bei in-vial LLE erfolgt die Extraktion in einem Autosampler-Vial und die erforderliche Empfindlichkeit wird durch LVI erlangt [201]. Eine stärkere Aufkonzentrierung wurde bei mLLE durch Veränderung des Phasenverhältnisses erhalten [198]. Chloraniline ließen sich so mit Wiederfindungsraten >50 % extrahieren, wohingegen Nitroaniline bei dem kleineren Verhältnis zwischen organischer und wässriger Phase nicht angereichert wurden.

Verglichen mit der mLLE ist die organische Phase bei der SPME an eine Glasfaser gebunden. Da die Phasenverhältnisse ähnlich sind, beschränken sich auch hier die Arbeiten auf Alkyl-, Chlor- und Nitroaniline [43, 107, 204–220]. Die besten Ergebnisse wurden mit Chloranilinen erzielt [205, 206]. Bereits bei den nitrosubstituierten Anilinen finden sich nur noch Nachweisgrenzen im unteren µg/L-Bereich [207, 209, 210]. Besonders anschaulich lässt sich bei MÜLLER *et al.* mit abnehmenden K_{OW} -Werten der Anstieg der Nachweisgrenzen verfolgen [206]. Die Extraktion erfolgte dabei aus der wässrigen Lösung (direct-SPME) unter Verwendung von PDMS- [214, 215], PA- [205, 207, 210, 220], CW/DVB- [107, 206, 209, 210] bzw. PDMS/DVB- [212, 216] oder CW/TPR-Fasern [212, 216]. Ähnlich wie bei LLE [200] wurde versucht durch Immobilisierung von Kronenethern [213], Calixarenen [217], Hydroxyfullerenen [219] und Polyanilinen [218] die Extrahierbarkeit mit neuen Beschichtungen auf Sol-Gel-Basis zu verbessern. Die Zahl der SPME-Anwendungen mit HPLC-Kopplung ist angesichts der häufig beobachteten Peakverbreiterung und dem Aufquellen der Beschichtung in organischen Lösungsmitteln gering [212, 216].

Bei der direkten Extraktion biologischen Probenmaterials erfolgt eine rasche Zerstörung der Beschichtung und die Extrahierbarkeit der Analyten wird durch Proteine vermindert [107, 108]. Durch starke Verdünnung lässt sich die Lebensdauer der Fasern auf Kosten der Empfindlichkeit verbessern [220]. Die Anwendungen werden bei Headspace-SPME aber durch die geringe Flüchtigkeit der primären aromatischen Amine be-

grenzt [206]. DEBRUIN *et al.* nennen für die Bestimmung von Alkyl- und Chloranilinen in Urin, Blut und Muttermilch mit HS-SPME-GC-MS Nachweisgrenzen zwischen 0,4 und 7,7 µg/L [208] und PUENTE *et al.* weisen mit diesem Verfahren 2,6DMA in Muttermilch nach [43]. Vergleichbare Nachweisgrenzen nennen auch GUAN *et al.* für die Bestimmung von Dinitroanilin-Herbiziden in Blut und Urin nach Headspace-Extraktion [211].

Angesichts dieser Einschränkungen für polare Verbindungen erfolgt die Extraktion aus Urin [15, 21, 22, 27, 40, 51, 55, 57, 59–61, 66, 81, 82, 221, 222] und Blut [19, 21, 27, 42, 51, 58, 59, 62, 63, 69, 71, 73, 75, 78, 79, 83, 84, 223–225] hauptsächlich durch LLE. ANGERER beschreibt eine Methode zur Bestimmung aromatischer Amine in Urin, Plasma und Erythrocyten, bei der nach saurer Hydrolyse mit einer 3stufigen LLE (Extraktion aus alkalischer Lösung mit Toluol, Rückextraktion mit verdünnter Schwefelsäure gefolgt von einer weiteren Extraktion mit Toluol) gearbeitet wird [51]. Durch die Rückextraktion, bei der der basische Charakter der Verbindungen ausgenutzt wird, lassen sich so störende Verbindungen abtrennen. Um eine rasche Phasentrennung herbeizuführen, wird häufig ein unpolares Lösungsmittel wie Hexan, Toluol oder Benzol verwendet [15, 27, 40, 42, 51, 57–61, 63, 66, 69, 71, 75, 78, 79, 221, 222]. Einige Autoren berichten insbesondere bei Verwendung polarer organischer Lösungsmittel wie Chloroform und Dichlormethan von Emulsionen und nur aufwendig zu trennenden Phasen [19, 21, 27, 69, 73, 79, 84, 223]. Dagegen ist die Zahl der Anwendungen unter Verwendung der Festphasenextraktion gering [17, 54, 56, 64, 226–228].

Eine weitere interessante Variante stellt das von QUIRINO und TERABE entwickelte Sweeping dar, eine on-line Anreicherung für die mizellare elektrokinetische Chromatographie (Micellar electrokinetic chromatography, MEKC) [229, 230]. Durch eine geschickte Wahl der Puffer- und Mizellenbildner-Konzentration sowohl in der Probe als auch in der Kapillare können größere Volumina injiziert und so eine mehr als 10000fache Anreicherung erreicht werden. Von ISOO *et al.* [231] und QUIRINO *et al.* [229] wurde Sweeping erstmals für die Anreicherung von aromatischen Aminen verwendet.

5.2 Trennung und Detektion

Zur Trennung aromatischer Amine ist die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography, HPLC) vielseitig einsetzbar [169–171, 173, 178, 180, 181, 183, 184, 188, 192–197, 200, 202, 203, 212, 216, 232–238]. Neben alkylierten, halogenierten und methoxysubstituierten Aminen wurden Nitroaniline und Diaminoverbindungen ebenso getrennt wie Naphthylamine und Aminobiphenyle. Dabei wurden fast ausschließlich Umkehrphasenmaterialien eingesetzt. Daneben verwenden DELÉPEÉ *et al.* eine Hypercarb-Säule [237] und UNGER *et al.* die Normalphasenchromatographie zur Trennung der Aniline [238]. Des Weiteren lassen sich die Amine durch Ionenchromatographie unter Verwendung von Kationenaustauschern trennen [200].

Die Detektion der Analyten erfolgte vor allem mit den universell einsetzbaren UV/Vis- bzw. Diodenarray-Detektoren [169–171, 173, 178, 180, 183, 188, 192–194, 197, 200, 202, 212, 216, 233, 234, 236]. Daneben eignet sich die Oxidation der Amine für eine elektrochemische Detektion [181, 184, 196, 202, 203, 233, 234], die verglichen mit UV/Vis-Detektion höhere Empfindlichkeit und Selektivität bietet [202, 233, 234]. Als Arbeitselektrode wird eine Glaskohlenstoffelektrode verwendet. Mit Poly(3-methylthiophen)-modifizierten Kohlenstoff-Nanoröhren wird die Überspannung reduziert und die Empfindlichkeit deutlich verbessert [232]. Für Chlorbenzidine wurden der elektrochemischen Detektion vergleichbare Empfindlichkeiten mit massenspektrometrischer Detektion erreicht [181]. Neben der hier verwendeten APCI [181], wurden ESI [195, 237] und TSP [235] als Interfaces eingesetzt.

Da aromatische Amine wenig flüchtig sind und leicht an Glasoberflächen adsorbiert und zersetzt werden, sind bei der Gaschromatographie häufig Tailing und Ghost-Peaks zu beobachten [239]. Die Gaschromatographie ist aus diesem Grunde nur für einige Verbindungen geeignet [37, 43, 107, 160–167, 182, 185, 190, 198, 199, 201, 204–211, 213–215, 217–220, 240–242]. Ungeachtet der Probleme wurden alkylierte, halogenierte, nitrierte Aniline sowie Naphthylamin und Aminobiphenyle getrennt. Das Spektrum der untersuchten Verbindungen ist verglichen mit HPLC eingeschränkt. Während für alkylierte und halogenierte Aniline zumeist eine Säule mit 5 % Phenyl-Anteil genügt, werden für die polaren Diaminoverbindungen häufig 35 %

Phenyl-Gehalt bzw. Säulen auf Polyethylenglycol-Basis (PEG- oder WAX-Säulen) benötigt [164, 185, 190, 240, 241]. Massenspektrometrische Detektion [43, 161, 163–167, 182, 185, 201, 205, 206, 208, 209, 214, 215, 220, 241, 242] ist ebenso weit verbreitet wie die Verwendung eines Flammenionisations- [37, 161, 207, 208, 210, 213, 217–219, 240] oder Stickstoff-selektiven Detektors [107, 160, 162, 167, 190, 198, 220]. Für die Elektroneneinfang-Detektion eignen sich besonders die nitrosubstituierten Verbindungen [198, 199, 204, 211, 219]. In der Mehrzahl der Fälle werden die aromatischen Amine allerdings zur Verbesserung von Trennung und Detektion vor der gaschromatographischen Analyse derivatisiert.

Die elektroseparativen Techniken gestatten die rasche Trennung alkylierter, halogener, nitrierter Amine und Diamine [172, 179, 189, 191, 229, 231, 243]. Die Autoren bedienen sich dabei der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) [189, 191, 229, 231] wie der Kapillarzonen-elektrophorese (capillary zone electrophoresis, CZE) [172, 179, 243] unter Verwendung von UV/Vis- [172, 179, 189, 191, 229], elektrochemischer [243] und massenspektrometrischer Detektion [231]. Daneben wurden von SHIN *et al.* auch erstmals die Trennung aromatischer Amine auf einem Microchip beschrieben [244]. Ähnlich der MEKC [189] gelingt auch hier die Trennung in nur etwa 2 min. Durch Verwendung eines Bor-dotierten Diamanten als elektrochemischer Detektor wurde die Detektion gegenüber der herkömmlichen Glaskohlenstoff-Elektrode verbessert [244].

5.3 Derivatisierung aromatischer Amine

Mittlerweile stehen eine große Zahl von Reagenzien zur Derivatisierung aromatischer Amine zur Verfügung (vgl. Abb. 4). Ziel ist bei der Gaschromatographie neben einer empfindlichen Detektion die Veränderung der chromatographischen Eigenschaften. Das gilt insbesondere für Aniline, deren Eigenschaften in den meisten Fällen eine Derivatisierung erforderlich machen (vgl. Kap. 5.2). Gängige Derivatisierungen zur Verbesserung der Trennung und Detektion aromatischer Amine sind in einem Übersichtsartikel von KATAOKA zusammengefasst [239]).

Die größte Bedeutung haben mit Abstand Acylierungen mit Carbonsäureanhydriden. So entfallen mehr als die Hälfte der Publikationen auf Derivatisierungen mit Carbonsäureanhydriden. Dies lässt sich u.a. auf die Empfindlichkeit zurückführen, mit der die Derivate perfluorierter Anhydride mit ECD [51, 57, 222, 245] oder NCI-MS [40, 58, 85, 86, 224, 246, 247] detektiert werden können. Von den am häufigsten verwendeten Anhydriden AA [248, 249], TFAA [250], PFPA [58, 60, 61, 86, 246] und HFBA [51, 57, 85, 222, 224, 247] zeigten PFPA und HFBA die beste Empfindlichkeit [23], da sich mit zunehmender Zahl der Fluor-Substituenten das Elektronenakzeptor-Verhalten und somit die Empfindlichkeit verbessert [239]. So lassen sich mittels negativer chemischer Ionisation mit Methan im SIM-Modus noch 10 - 30 fg der Ausgangssubstanz der alkylierten und halogenierten aromatischen Amine nach Derivatisierung mit HFBA nachweisen [247]. Die perfluorierten Reagenzien sind sehr reaktiv und eignen sich für eine große Zahl von Verbindungen. Untersucht wurden eine Vielzahl alkyl-, alkoxy- und

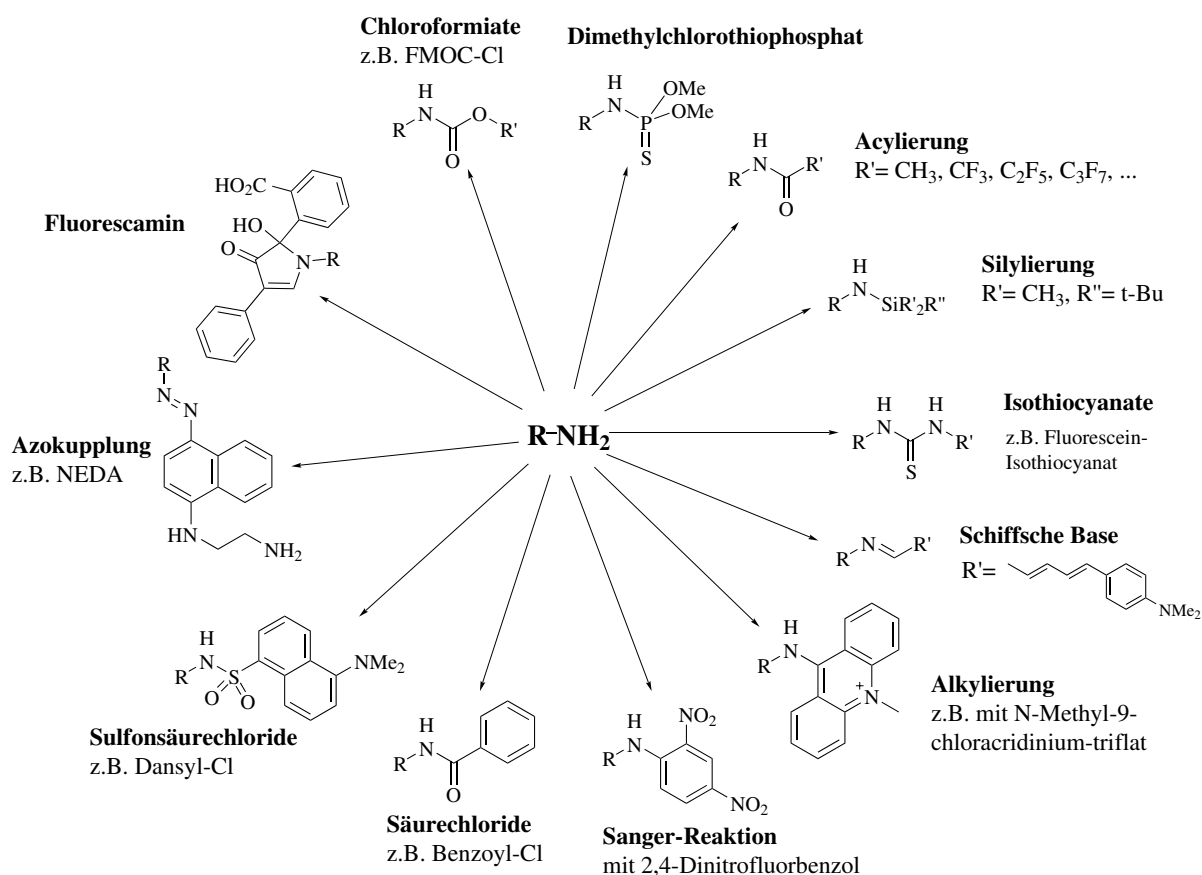


Abbildung 4: Übersicht über Derivatisierungsreaktionen aromatischer Amine

nitrosubstituierter sowie halogenerter Amine und Diamine. Für Amine, bei denen das Stickstoffatom der Aminogruppe durch elektronenziehende Substituenten wie Nitrogruppen weniger nucleophil ist, nennen WEISS *et al.* um Faktor 10 höhere Nachweisgrenzen verglichen mit alkylierten Anilinen [61]. Ebenso berichtete LESS bei Untersuchung von Aminobenzoesäuren mit Pentafluorbenzylbromid deutlich schlechtere Empfindlichkeiten bei nitrosubstituierten Verbindungen [177].

Nachteil der hohen Reaktivität der Reagenzien ist die ausgesprochen geringe Toleranz gegenüber protischen Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol. Während die einmalige Umsetzung von Aminophenolen mit Essigsäureanhydrid direkt in wässriger Lösung abläuft, erfordert die vollständige Derivatisierung auch der zweiten funktionellen Gruppe (Aminogruppe) mit TFAA aprotische Bedingungen [249]. Die ausgesprochene Hydrolyseempfindlichkeit ist darüber hinaus der Grund, warum Silylierungen nur selten zu finden sind [244, 251].

Derivatisierungen von alkylierten und halogenierten Anilinen in Gegenwart von Wasser wurden von MISHRA *et al.* und KIJIMA *et al.* mit Benzoylchlorid bzw. Dimethylchlorothiophosphat durchgeführt [252, 253]. Angesichts des hohen Reagenzüberschusses sind diese Reagenzien nur bedingt für wässrige Lösungen geeignet und erfordern eine rasche Umsetzung. Dagegen erweisen sich die von DASGUPTA und ANGELINO *et al.* verwendeten Chloroformiate als deutlich besser geeignet [254, 255]. So können Aminophenole direkt in wässriger Lösung gleichzeitig an der Amino- und der Hydroxygruppe derivatisiert werden [255].

Die höhere Stabilität in Wasser aufgrund geringerer Elektrophilie geht jedoch in jedem Fall auf Kosten der Reaktivität gegenüber den Analyten. So ist das von der Aminosäureanalytik bekannte Sanger-Reagenz (2,4-Dinitro-fluorbenzol) gegenüber Wasser stabil, versagt jedoch bei der Umsetzung mit Nitroanilinen [256]. Ebenso eingeschränkt ist die Anwendung von Aldehyden zur Bildung Schiffscher Basen mit den untersuchten aromatischen Aminen [257].

Die Derivatisierungen werden bei der Flüssigchromatographie in erster Linie eingesetzt, um die Detektierbarkeit der Verbindungen zu verbessern. Aus diesem Grunde verfügen die Reagenzien für den Einsatz in der Flüssigchromatographie über einen entsprechen-

den Chromophor, der speziell an die UV/Vis- bzw. Fluoreszenz-Detektion angepasst ist. Ein Beispiel dafür ist Dansyl-Cl, das von GEERDINK für die Derivatisierung nach SPE verwendet wurde [258]. Fluorescamin und FMOC-Cl sind auch für die Derivatisierung in wässriger Lösung geeignet [259, 260]. In Kombination mit Fluoreszenz-Detektion lassen sich sowohl mit HPLC [259] wie MEKC [261, 262] sehr gute Empfindlichkeiten erzielen. Ebenso wie Fluorescamin wurde N-Methyl-9-chloro-acridiniumtriflat, bei dem der Chlor-Substituent durch das Amin ersetzt wird, für die Nachsäulen-Derivatisierung eingesetzt [263]. Von CAMPÍNS-FALCÓ wird eine Festphasen-Derivatisierung mit FMOC-Cl beschrieben, die Extraktion und Derivatisierung auf einfache Weise kombiniert [264]. Im Gegensatz dazu erfolgt bei BREDE *et al.* die Festphasen-Derivatisierung (solid-phase analytical derivatization, SPAD) mit dem hydrolyseempfindlichen TFAA erst im Anschluss an die Derivatisierung [186]. Die Umsetzung mit FMOC-Cl in wässriger Lösung wurde von DWORSCHAK bei der Bestimmung amphoterer aromatischer Amine wie Aminophenolen, Aminobenzolcarbon- und -sulfonsäuren verwendet [260]. Die Umsetzung verläuft annähernd quantitativ, abgesehen von deaktivierten nitrosubstituierten Analyten. Ähnliches gilt für die Umsetzung der von der Aminosäureanalytik bekannten Isothiocyanate wie Fluorescein-Isothiocyanat, dessen Derivate sehr empfindlich mit Fluoreszenz-Detektion bestimmt werden können [265].

Bei allen bislang genannten Reagenzien beruht die Derivatisierung auf der Nucleophilie der aromatischen Amine, die mit einem elektrophilen Agens umgesetzt werden. Insofern besteht stets eine Konkurrenz zwischen den Aminen und Wasser, das als Nucleophil gleichfalls mit dem Reagens reagieren kann. Eine Ausnahme bildet die von SCHMIDT *et al.* entwickelte Bromierung, bei der die Reaktion statt am Stickstoffatom am aromatischen Ring stattfindet [176, 266, 267]. Die vollständige Bromierung ist schwierig, so dass häufig Gemische gebildet werden. Daneben beruht einzig die Diazotierung auf einem anderen Mechanismus und gestattet die Umsetzung einer Vielzahl aromatischer Amine. So wurden eine große Zahl nitrierter und dinitrierter Aniline, Aminobenzoesäuren und Aminobenzolsulfonsäuren von REITERMAYER [268], PETERSMANN [269] und VOLKWEIN [270] diazotiert und anschließend mit NEDA zu einem Azofarbstoff gekuppelt.

HAAS *et al.* kuppelten die diazotierten Amine mit Iodid, wodurch aromatische Iod-

Verbindungen entstanden [271]. Diese eignen sich für die Gaschromatographie und können mittels ECD empfindlich detektiert werden. Dazu wurden die Verbindungen mit SPE extrahiert, anschließend in wässriger Lösung derivatisiert und mit GC-ECD [174, 175] bzw. GC-AED [176] bestimmt. Für 46 alkylierte, halogenierte, nitrierte, methoxysubstituierte Aniline und Dianiline sowie Naphthylamine und Aminobiphenyle erhält man so Nachweisgrenzen im Bereich von 0,4 bis 7,8 µg/L.

6 Aufgabenstellung

Die Probenvorbereitung vieler Analyseverfahren ist nur wenig effizient. Von der zur Verfügung stehenden Stoffmenge wird häufig nur ein kleiner Bruchteil für die Analyse genutzt. Die Festphasenmikroextraktion ist diesbezüglich effizienter und konnte sich aufgrund verschiedener Vorzüge neben Festphasenextraktion und Flüssig-flüssig-Extraktion etablieren. Nach 15 Jahren SPME ist die Extraktion polarer Verbindungen immer noch problematisch, da sich diese nur ungenügend anreichern lassen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Extrahierbarkeit durch ein in-situ Derivatisierungsverfahren zu verbessern, um auch polare aromatische Amine zugänglich zu machen. Grundlage war die in der Arbeitsgruppe STORK entwickelte Derivatisierung, mit der Aniline nach Festphasenextraktion zu aromatischen Iodiden umgesetzt werden [174, 175, 271]. Nach den Vorarbeiten von KELZ [149] sollte das Verfahren an die SPME angepasst werden mit dem Ziel, aromatische Amine in Wasserproben mit GC-MS zu bestimmen.

Des Weiteren sollten die besonderen Eigenschaften der Derivate näher untersucht werden. Da bei der Derivatisierung die Aminogruppe durch Iod ersetzt wird, bietet sich die Möglichkeit, die Verbindungen selektiv mit GC-AED zu detektieren. Ohne Störungen durch Matrixbestandteile sollten sich auf diese Weise aromatische Amine leicht auffindig machen lassen.

Da bei der SPME geringe Probevolumina genügen, kommt das Verfahren auch für biologische Matrices in Frage. Eine komplexe Matrix wie Urin stellt besondere Ansprüche an die Derivatisierung. Deshalb müssen geeignete Bedingungen gefunden werden, um das Verfahren auch auf biologische Matrices anwenden zu können.

Als weitere Voraussetzung, um biologische Matrices untersuchen zu können, ist zum Schutz der SPME-Faser eine Extraktion aus dem Headspace erforderlich. Da aromatische Iod-Verbindungen bislang noch nicht aus dem Headspace angereichert wurden, mussten geeignete Extraktionsbedingungen entwickelt werden.

Bislang gab es keinerlei Verfahren, mit denen sich die aromatischen Amine in Urin umfassend untersuchen lassen. So wurden, ungeachtet der Toxizität von Aminobiphenyl bislang noch in keiner Arbeit substituierte Aminobiphenyle untersucht. Nach den Vorar-

beiten von PÖTZ [272] sollte das Verfahren zur Identifizierung unbekannter aromatischer Amine in Urin genutzt werden. Da eine Vielzahl von Matrix-Verbindungen gleichfalls mit den Derivatisierungsreagenzien reagieren kann, war zu klären, wie die erforderliche Selektivität erreicht werden kann. Zur Abtrennung von Matrixbestandteilen kann eine Extraktion der Amine vor der Derivatisierung beitragen ebenso wie die Extraktion der Derivate aus dem Headspace.

7 Ergebnisse

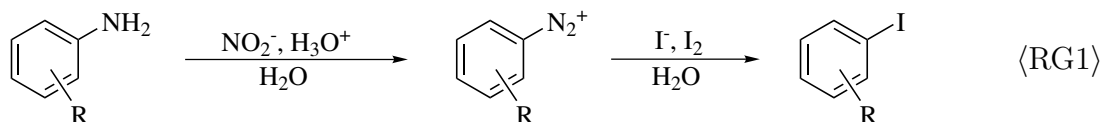
Der Ergebnisteil ist in vier Kapitel unterteilt. Das entwickelte in-situ Derivatisierungsverfahren für die Festphasenmikroextraktion wird zunächst in Kap. 7.1 vorgestellt und die Eigenschaften der Derivate untersucht. Die anschließenden Arbeiten unterteilen sich in den qualitativen Nachweis und die Identifizierung aromatischer Amine in Urin (vgl. Kap. 7.3) sowie die Quantifizierung der Derivate (vgl. Kap. 7.4). Im ersten Fall wurde mit GC-AED gearbeitet, wohingegen die Bestimmung der aromatischen Amine mit GC-MS erfolgte. Die Arbeiten zur Festphasenmikroextraktion der Derivate sind zweigeteilt. Für das Screening wurden die Eignung der Headspace-Extraktion untersucht, wohingegen bei der Quantifizierung direkt extrahiert wurde. Die Bestimmung der Extraktionsraten mit depletion-SPME werden in Kap. 7.2 behandelt. Erste Untersuchungen zur Eignung von depletion-SPME erfolgten mit Pestiziden, um die Probenvorbereitung zu vereinfachen.

Da sich dabei die Zusammensetzung der untersuchten aromatischen Amine in den Kapiteln unterscheidet, werden diese zu Beginn jedes Kapitels zusammen mit den Messbedingungen vorgestellt. Dabei ist zu beachten, dass in Chromatogrammen und Tabellen bei der Bezeichnung der Derivate die Namen der Ausgangsverbindungen beibehalten wurde, um eine Zuordnung zu den aromatischen Aminen zu erleichtern und zusätzliche Abkürzungen zu vermeiden. Im jeweiligen Kontext wird darauf hingewiesen, dass es sich trotz der Bezeichnung als aromatische Amine um deren Derivate handelt.

7.1 Derivatisierung

7.1.1 Durchführung

Die Derivatisierung aromatischer Amine erfolgte in Anlehnung an die von KELZ [149] und SCHMIDT *et al.* [175] beschriebenen Derivatisierungsvorschriften (vgl. Rktgl. <RG1>). Der Ablauf der optimierten Derivatisierung, wie sie hier in Verbindung mit der Festphasenmikroextraktion eingesetzt wurde, ist in Abb. 5 dargestellt.



R= Alkyl, Aryl, Halogen, Nitro

In einem 25 mL Vial wurden 10 mL der wässrigen Probe mit 200 μL 55 %iger Iodwasserstoffsäure versetzt und 500 μL Natriumnitrit-Lösung ($\beta = 10$ g/L) zugegeben (vgl. Kapitel 10.4.4). Für eine bessere Umsetzung deaktivierter aromatischer Amine (vgl. Kap. 7.1.3) wurde die Menge an Natriumnitrit-Lösung später auf 400 μL ($\beta = 50$ g/L) erhöht. Die Lösung hat dabei einen pH-Wert von 1-1,5. Anschließend wurden die Vials für 20 min geschüttelt. Bei reger Gasentwicklung färbt sich die Lösung braun, da bei der

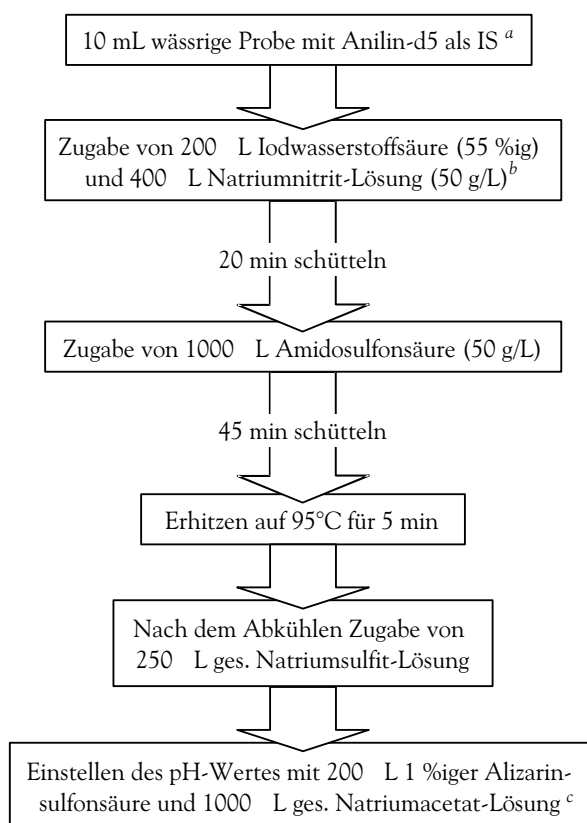
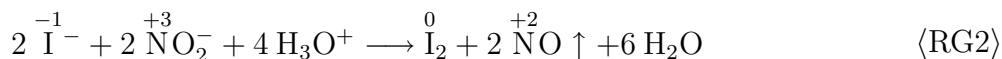
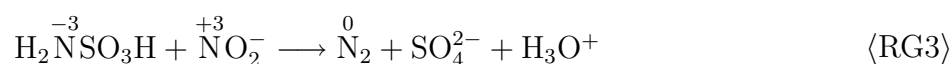


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Derivatisierung. Alternativ wurden ^a bei 5 mL Probe alle Mengenangaben halbiert, ^b nur 200 μL NaNO_2 -Lösung (10 g/L) zugegeben bzw. ^c der pH-Wert durch Zugabe von 250 μL K_2HPO_4 -Lösung (0,25 mol/L) und 400 μL NaOH (5 mol/L) eingestellt.

Reaktion Iod gebildet wird, das zusammen mit Iodid als Komplexanion I_3^- in Lösung geht. Das Iod setzt sich als schwarzer Niederschlag an der Oberfläche und an der Glaswand ab. Gleichzeitig wird in einer Nebenreaktion das Iodid auch durch das Nitrit zu Iod oxidiert [273]. Dabei entsteht Stickstoffmonoxid, das mit Sauerstoff das braune Gas Stickstoffdioxid bildet.



Zur Zerstörung des überschüssigen Nitrits (vgl. Rktgl. [\(RG3\)](#)) wurde 1 mL Amidosulfonsäure ($\beta = 50$ g/L) zugegeben und die Lösung weitere 45 min geschüttelt. Dabei kommt es erneut zur Gasentwicklung und der Niederschlag verschwindet.



Durch 5 minütiges Erhitzen im Wasserbad bei 95°C wurden die nicht umgesetzten Diazoniumionen zu Phenolen umgesetzt. Gleichzeitig wird überschüssige Amidosulfonsäure zersetzt. Nach dem Abkühlen wurden 250 µL gesättigte Natriumsulfidlösung zugegeben, um das verbliebene Iod zu reduzieren. Die anfangs bräunliche Lösung entfärbt sich dabei. Nun wurden 250 µL einer *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (0,25 mol/L) sowie 400 µL Natronlauge (5 mol/L) zugegeben, um den pH-Wert auf 9 einzustellen.

Die Einstellung des pH-Wertes dient in erster Linie dem Schutz der verwendeten PDMS/DVB-Faser, für die vom Hersteller ein Einsatz im Bereich von pH 2 bis 11 empfohlen wird. Da die Pufferkapazität des Phosphat-Puffers gering ist, lässt sich auf diese Weise der pH-Wert nur schwer präzise einstellen. Aus diesem Grund erfolgte später die Einstellung durch Zugabe von 1000 µL gesättigter Natriumacetat-Lösung.

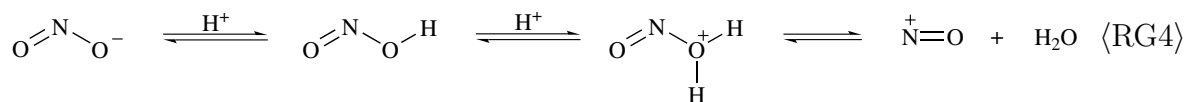
Die Überprüfung des pH-Wertes mit einem pH-Meter ist in Anbetracht der kleinen Volumina schwierig und die Probenzusammensetzung wird dabei verändert. Statt des Einsatzes von Spezialindikatorpapier, wurde der pH-Wert durch Zugabe des Indikators zur Lösung überprüft. Dazu bedarf es eines Indikators mit einem Umschlagspunkt, der dem des Pufferpunkts von Natriumacetat ($pK_s = 4,75$) möglichst nahe kommt. Er sollte in geringer Menge zugegeben die Extraktion nicht beeinflussen und selbst nicht extrahiert werden. Weiterhin sollte der Indikator in Wasser gelöst werden, um die Extraktion durch

organische Lösungsmittel nicht zu beeinflussen. Aus diesem Grunde wurden vor der Zugabe von Natriumacetat-Lösung 200 μL einer 1 %igen Alizarinsulfonsäure-Lösung in Wasser zugefügt. Der Indikator schlägt im Bereich von 4,3 - 6,3 von gelb nach rotviolett um und führt unter den Bedingungen zu einer orangen Lösung entsprechend $\text{pH} \approx 5$. Auf diese Weise lässt sich der pH-Wert auf etwa 0,2 pH-Einheiten genau und reproduzierbar einstellen und überwachen.

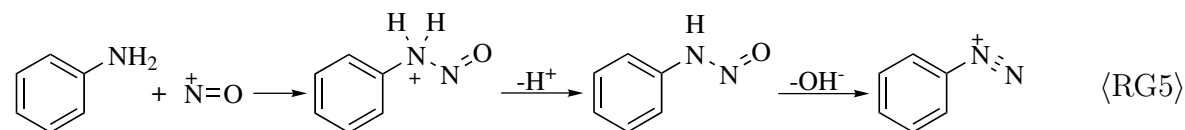
Die Derivatisierung wurde in gleicher Weise mit nur 5 mL Probe durchgeführt. Dazu wurden die Reagenzmengen halbiert, aber alle weiteren Parameter belassen.

7.1.2 Reaktionsmechanismus

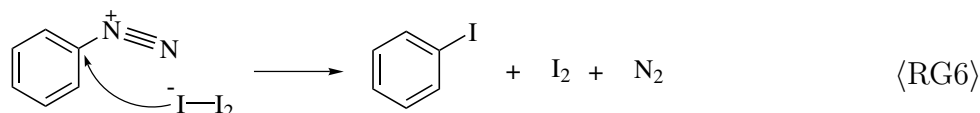
Bei der Diazotierung reagiert das freie Amin in einer säurekatalysierten Reaktion mit einem elektrophilen Nitrosierungsreagenz [274, 275]. Ob dies NO^+ oder ein durch Anlagerung von Wasser, Nitrit oder Iodid gebildetes Addukt ist, hängt von den Reaktionsbedingungen ab (vgl. Rktgl. (RG4)).



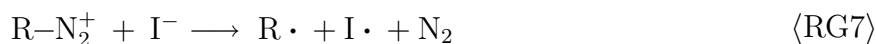
Dieser Angriff ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. In seiner Folge stabilisiert sich die Verbindung rasch unter Abspaltung von Wasser (vgl. Rktgl. (RG5)). Je nach Reaktionsbedingungen kann auch die Bildung des Nitrosierungsreagenz geschwindigkeitsbestimmend werden. Dabei spielt neben den Konzentrationen der Reagenzien der pH-Wert eine große Rolle [275].



Das Diazoniumion wird im zweiten Schritt der Reaktion rasch durch Iodid abgefangen. Dies liegt als Komplexanion I_3^- vor [276].



Ist Iod nicht in ausreichender Menge vorhanden, so kann es gemäß den Rktgl. [\(RG7\)](#)-[\(RG9\)](#) in einer radikalischen Reaktion entstehen [\[276\]](#). Aus diesem Grund muss im Gegensatz zur SANDMEYER-Reaktion kein Cu(I) zugegeben werden [\[276–278\]](#).



7.1.3 Reaktivität und Stoffumsatz

Die Nucleophilie wird durch Substituenten mit +I und +M-Effekt wie –Alkyl, –OH, –NH₂ und –OR erhöht und durch Gruppen mit -I und -M-Effekt wie –Hal, –NO₂ und –NR₃⁺ verringert. Dementsprechend gering ist die Reaktivität letzterer bei der Diazotierung [\[279, 280\]](#). Durch Erhöhung der H⁺-Konzentration lässt sich, wie in [Kap. 7.1.2](#) gezeigt, die Reaktivität des Nitrosyl-Kations steigern (vgl. Rktgl. [\(RG4\)](#) auf Seite [42](#)), so dass sich auch desaktivierte aromatische Amine diazotieren lassen. Mit abnehmendem pH-Wert ist der Sauerstoff der Hydroxylgruppe der salpetrigen Säure immer weniger in der Lage, das Elektronendefizit des Stickstoffs zu kompensieren, wodurch dessen Elektrophilie zunimmt.

Umgekehrt wird die Aminogruppe mit zunehmender H⁺-Konzentration stärker protoniert und verliert damit die Fähigkeit zum nucleophilen Angriff. Davon am stärksten betroffen sind die stark basischen Amine, da bei diesen nur noch in geringem Maße freie Amine vorliegen. Die Basizität wird gleichermaßen wie die Nucleophilie durch Substituenten mit +I und +M-Effekt erhöht und umgekehrt durch -I und -M-Substituenten herabgesetzt. Demzufolge ist der pH-Wert ein wichtiger Parameter, mit dem die Reaktivität beeinflusst werden kann. Darin unterscheidet sich die Diazotierung von den anderen

Derivatisierungsreaktionen, bei denen desaktivierte Nitroaniline nur in geringem Maße umgesetzt werden [61, 177, 260].

Dagegen wird die Umsetzung mit dem Iodid neben sterischen Effekten maßgeblich durch die Elektrophilie des Diazoniumions gesteuert. Aus diesem Grunde reagieren elektronenarme Aromaten leichter als elektronenreiche, weshalb die Umsetzung mit Iodid durch elektronenziehende Substituenten begünstigt wird. Dies gilt besonders, wenn sich die Substituenten in *o/p*-Position befinden.

Die Bedeutung der Basizität lässt sich bei Variation des pH-Wertes untersuchen. Dazu wurden Proben mit einer Analytkonzentration von 0,5 mg/L mit 50 μ - 2000 μ konz. Salzsäure angesäuert, entsprechend pH-Werten zwischen 0,9 und -0,5 (berechnet), und anschließend mit 200 μ L Natriumnitrit-Lösung (50 g/L) versetzt. Da Iodwasserstoffsäure

Tabelle 4: Parameter zur Trennung und Detektion aromatischer Amine nach Derivatisierung mit GC-AED unter Verwendung einer HP5-Säule und Flüssiginjektion

Gerät	GC-AED mit HP GC 6890, AED G 2350 und Autosampler HP7673
Trennsäule	HP5, 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke
Injektor	Split/splitless mit 0,8 mm SPME-Liner
Injektortemperatur	250°C isotherm
Injektion	1 μ L, splitlos
GC-Programm	40°C für 2 min, mit 10°C/min auf 190°C mit 30°C/min auf 280°C, 5 min halten (Gesamtdauer: 25 min)
Trärgas	Helium, 2 mL/min
Detektion	Elementspuren I183, I206, C179 Reaktandgase: O ₂ : 32 psi, H ₂ : 10 psi, Makeup-Flow: 50 mL/min Helium Supply Pressure: 32 psi, Cavity Pressure: 1,8 psi Cavity-, Transferline-Temperatur: 250°C, 250°C

immer auch Nitrit reduziert, musste von ihrer Verwendung abgesehen werden. Stattdessen wurde nach 20minütiger Reaktion, in Anlehnung an HAAS *et al.*, eine Lösung bestehend aus Natriumiodid (100 g/L) und Iod (50 g/L) zugefügt [271]. Nach der Umsetzung wurden die Derivate mit 1 mL *n*-Hexan extrahiert und jeweils 1 μ L bei der Bestimmung mit GC-AED injiziert (vgl. Tab. 4). Die Detektion erfolgte über die Iod-Spur I183. Die Peakflächen sind in Abb. 6 für die unterschiedlichen Säuremengen aufgetragen.

Am stärksten macht sich der Einfluss des pH-Wertes bei den alkylierten Aminen bemerkbar, wobei der Effekt bei 2,6DEA verglichen mit 2,6DMA aufgrund der stärkeren sterischen Hinderung weniger zum Tragen kommt. Im Gegensatz zu 2,6DMA und 2,6DEA ist der Einfluss des pH-Wertes bei 2,6DCA gering. Die elektronenziehende Wir-

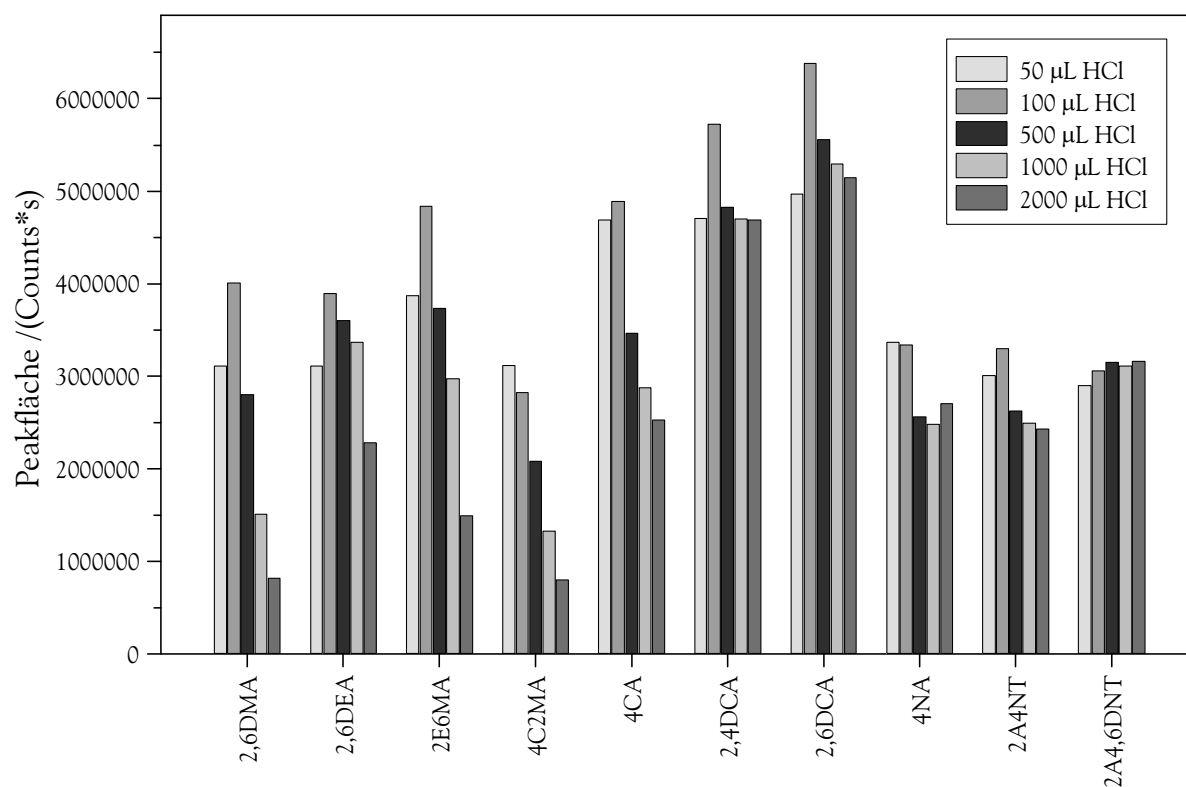


Abbildung 6: Einfluss der Säuremenge auf die Derivatisierung aromatischer Amine. 5 mL Probe mit den Analyten in einer Konzentration von 0,5 mg/L wurden mit 50 - 2000 μ L konz. HCl und 200 μ L NaNO_2 (50 g/L) diazotiert und nach 20 min mit 200 μ L Iodierungs-Reagenz (100 g/L NaI, 50 g/L I_2) versetzt. Nach Extraktion mit 1 mL *n*-Hexan wurden die Derivate mit GC-AED bestimmt.

kung der Chlor-Substituenten ist dabei deutlich geringer als die der NO₂-Gruppen, wie der Vergleich von 4CA und 4NA zeigt. Der pH-Wert ist besonders bei den dinitrierten Verbindungen wie 2A4,6DNT zu vernachlässigen. Um für möglichst viele Verbindungen geeignete Bedingungen zu gewährleisten, empfiehlt sich ein für die Diazotierung moderater pH-Wert von ca. 1, wie er bei Zugabe von 100 µL HCl erreicht wird.

Zur Beurteilung der Reaktivität der untersuchten aromatischen Amine bei der Derivatisierung werden idealerweise Reaktionsausbeuten herangezogen. Da die Synthese der dazu benötigten Standards aufwendig ist und dem Informationsgewinn nicht gerecht wird, wurde stattdessen der Stoffumsatz kontrolliert. Dieser eignet sich ebenfalls zur Beurteilung der Reaktivität der aromatischen Amine, weil die Derivatisierung in zwei Schritten verläuft und die Diazotierung nicht reversibel ist.

Dazu wurden von den Analyten Einzelstandards hergestellt, indem die Stammlösungen in Methanol im Verhältnis 1:100 mit Wasser auf eine Konzentration von 10 mg/L verdünnt wurden. Ein Aliquot wurde als Vergleichslösung vor der Derivatisierung untersucht. Weitere 10 mL wurden durch Zugabe von 200 µL 55 %iger Iodwasserstoffsäure sowie 500 µL Natriumnitrit-Lösung (10 g/L) derivatisiert (vgl. Kap. 7.1.1) und im An-

Tabelle 5: Parameter zur Trennung und Detektion von Einzelstandards mit HPLC-UV

Gerät	Gynkotek HPLC mit UV-Detektor UVD160S
Trennsäule	Purospher RP18 125 × 3 mm, 5 µm Teilchengröße
Injektionsvolumen	100 µL
Flussrate	0,8 mL/min
Eluenten	A: Phosphat-Puffer (10 mmol/L, pH 7) B: Methanol
Gradientenprogramm	70 % A, 30 % B (V/V) für 10 min in 20 min auf 20 % A, 80 % B (V/V) weitere 15 min 20 % A, 80 % B (V/V)
Detektionswellenlängen	254 nm, 230 nm

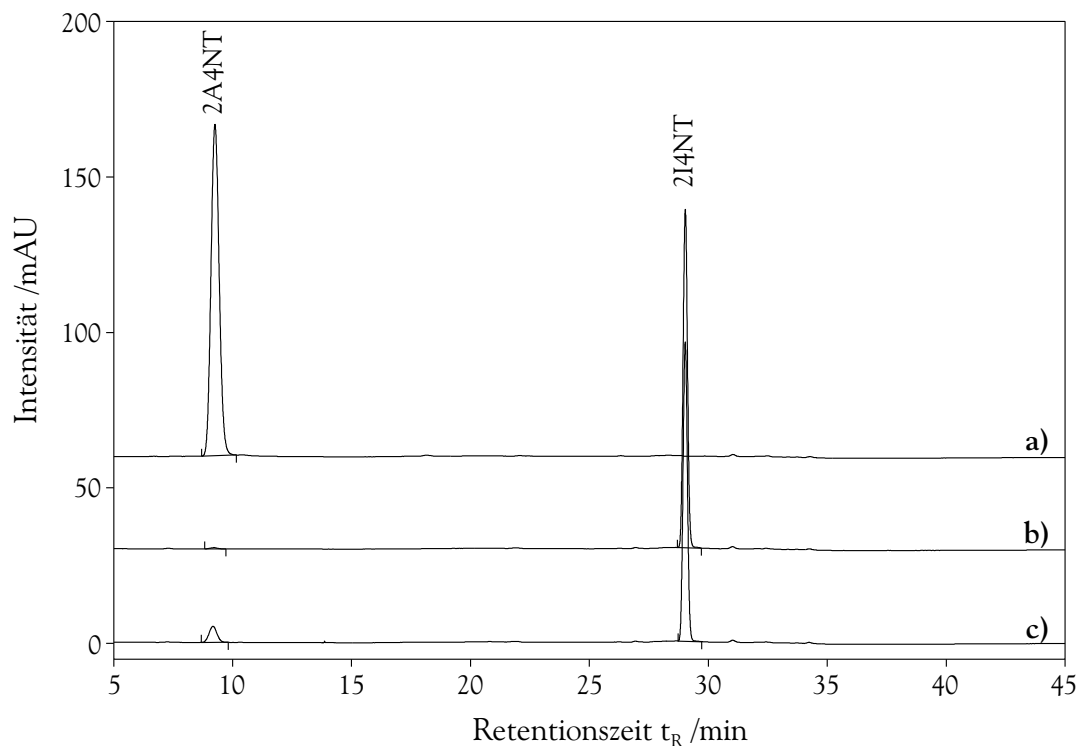


Abbildung 7: Bestimmung des Stoffumsatzes am Beispiel von 2A4NT. Dargestellt sind die Chromatogramme a) vor Derivatisierung, b) nach Derivatisierung und c) nach Zugabe von 2A4NT. Die Bestimmung erfolgte mit HPLC-UV bei 254 nm (vgl. Tab.5).

schluss mit 10 %igem Ammoniak neutralisiert. Zur Bestimmung des Stoffumsatzes wurden 500 μL entnommen. Der verbleibenden Lösung wurden 5 μg der Ausgangsverbindung zugesetzt, entsprechend 5 % der anfänglichen Stoffmenge, um so durch Standardaddition Verdünnungseffekte u.ä. besser ausgleichen zu können. Die Konzentration der Amine in dieser sowie den Lösungen vor und nach Derivatisierung wurde mit HPLC-UV bestimmt. Die Bedingungen für die Trennung und Detektion der Verbindungen sind in Tab. 5 aufgeführt. Um eine möglichst gute Empfindlichkeit zu erreichen, wurden jeweils 100 μL injiziert. Die Detektion erfolgte abgesehen von 3C4FA (230 nm) bei 254 nm (vgl. Tab. 6). Abb. 7 veranschaulicht die Vorgehensweise anhand der Chromatogramme von 2A4NT a) vor, b) nach Derivatisierung sowie c) nach Standardaddition.

Tabelle 6: Übersicht über den Stoffumsatz bei der Derivatisierung. Dazu wurde jeweils ein Aliquot vor bzw. nach Derivatisierung injiziert. Ein weiterer Teil wurde mit Ausgangslösung versetzt und anhand des Peakflächenverhältnisses der Stoffumsatz bestimmt.

Analyt	Retentionszeit t_R /min ^c		Stoffumsatz ^d	
	Amin	Derivat	/%	
Anilin	3,11	28,61	99,5	^a
4AT	6,65	31,76	99,7	^a
4CA	10,17	31,40	99,7	^a
3,4DCA	21,25	34,17	99,7	^a
2,4,5TCA	28,33	36,94	97,8	^a
3C4FA	12,79	31,82	99,9	^b
2,4DAT	1,78	28,63	99,2	^a
2,6DAT	1,42	26,05	100	^a
2NaA	18,29	34,40	100	^a
2AB	25,06	34,04	94,5	^a
4AB	23,92	36,76	99,9	^a
4NA	3,99	25,27	97,2	^a
2A4NT	10,30	29,58	99,6	^a
2A6NT	8,11	28,84	98,1	^a
4A2NT	9,25	29,03	99,5	^a
2A4,6DNT	17,77	26,95	77,1	^a
4A2,6DNT	17,45	26,65	99,1	^a
2,4DA6NT	2,46	24,79	100	^a

detektiert bei ^a 254 nm bzw. ^b 230 nm, ^c Parameter vgl. Tab. 5, ^d bezogen auf das Edukt, bestimmt durch Standardaddition (5 % von n_0), Ausgangskonzentration $c_0 = 10$ mg/L, 10 mL Probe, derivatisiert mit 200 μ L 55 %iger HI und 500 μ L NaNO₂ (10 g/L).

Die Retentionszeiten von Ausgangsverbindungen und Derivaten sind in Tab. 6 gegenübergestellt. Die Derivate sind durchweg weniger polar und erfordern einen wesentlich höheren Methanol-Anteil für ihre Elution. Während die Dianiline die kürzesten Reten-

tionszeiten aufweisen, werden ihre Derivate zusammen mit den anderen Verbindungen eluiert. Nebenprodukte z.B. durch Umsetzen nicht umgesetzter Diazoniumionen zu den entsprechenden Phenolen oder Reaktionen mit Methanol zu Anisolen wurden nur in Einzelfällen beobachtet. Ausnahmen bilden die Diamino-Verbindungen, die infolge zweier Aminogruppen eine höhere Wahrscheinlichkeit für Nebenreaktionen bieten. Darüber hinaus sind die Verbindungen durch zwei Aminogruppen besonders aktiviert und gestatten damit auch Reaktionen, die gewöhnlich erst bei höheren Temperaturen ablaufen.

Zur Bestimmung der Konzentration nicht umgesetzten Amins wurden die Peakflächen nach Derivatisierung zu denen nach Standardaddition ins Verhältnis gesetzt. Die daraus resultierenden Stoffumsätze sind in Tab. 6 zusammengefasst. Mit alkylierten, chlorierten und nitrierten aromatischen Aminen und Diaminen sowie bicyclischen Verbindungen wurde eine Vielzahl von Verbindungen untersucht. Für fast alle untersuchten Aniline sind hohe Reaktivitäten mit Stoffumsätzen $>95\%$ zu beobachten.

Während bei 4AB annähernd quantitativer Umsatz erfolgt, ist er bei 2AB etwas gerin-

Tabelle 7: Parameter zur Trennung und Detektion von Gemischen aus aromatischen Aminen und Derivaten mit HPLC-UV

Gerät	Gynkotek HPLC mit UV-Detektor UVD160S
Trennsäule	Purospher RP18 125 × 3 mm, 5 µm Teilchengröße
Injektionsvolumen	100 µL
Flussrate	0,8 mL/min
Eluenten	A: Phosphat-Puffer (10 mmol/L, pH 7)/ Methanol 1/1 (V/V) B: Methanol
Gradientenprogramm	80 % A, 20 % B (V/V) für 5 min in 10 min auf 40 % A, 60 % B (V/V) weitere 5 min 40 % A, 60 % B (V/V)
Detektionswellenlängen	254 nm, 230 nm

ger. Infolge der Substitution in *ortho*-Position sind die Ringe gegeneinander verdreht. Die Wechselwirkung der π -Elektronensysteme beider Ringe ist dadurch gegenüber dem *para*-Isomeren vermindert, gleichbedeutend mit einem geringeren +M-Effekt. Lediglich bei dem stark desaktivierten 2A4,6DNT beträgt der Stoffumsatz nur 77 %. Verglichen mit 4A2,6DNT ist der Angriff sterisch gehindert. Im Gegensatz zu 2A4NT ist der Stoffumsatz viel geringer und veranschaulicht damit die Verringerung der Nucleophilie durch desaktivierende Nitrogruppen. Ebenso erklärt dies die Ergebnisse bei 4NA im Vergleich mit Anilin, 4AT und 4CA. Durch die Nitrogruppe wird einerseits die Basizität vermindert, andererseits aber auch die Nucleophilie, woraus ein verminderter Stoffumsatz resultiert. Somit wirken sich Substituenten, die die Elektronendichte am Stickstoffatom verringern, negativ auf die Nucleophilie aus. Nichtsdestotrotz lassen sich auch für stark desaktivierte Verbindungen noch gute Stoffumsätze erzielen.

Um auch für 2A4,6DNT einen möglichst vollständigen Stoffumsatz zu erreichen, wurde der Einfluss der Nitrit-Konzentration untersucht. Dazu wurde ein Standard verwendet, der die Analyten 4NA, 4A2NT und 2A4,6DNT in einer Konzentration von 10 mg/L und 4CA, 3,4DCA und 4AB in einer Konzentration von 20 mg/L enthielt. Jeweils 5 mL des Standards wurden mit 100 μ L Iodwasserstoffsäure angesäuert und mit 0 - 250 μ L Natriumnitrit-Lösung (50 g/L) versetzt (vgl. Kap. 7.1.1). Nach der Derivatisierung wurde 1 mL des Reaktionsgemisches mit 500 μ L Methanol versetzt, da die unpolaren Derivate rasch ausfielen und die Lösung trübten. Ausgangsverbindungen und Derivate wurden anschließend mit HPLC-UV bestimmt (vgl. Tab. 7).

Abb. 8 zeigt a) ein Chromatogramm nach Derivatisierung ohne Nitrit und b) nach Zugabe von 50 μ L Natriumnitrit-Lösung (50 g/L). Unter diesen Bedingungen ist die Umsetzung für 4CA, 3,4DCA, 4NA und vor allem 2A4,6DNT unvollständig. In Abb. 9 sind für 2A4,6DNT die Peakflächen der Derivate sowie die relativen Peakflächen der Ausgangsverbindung bezogen auf die Peakflächen ohne Derivatisierung für die unterschiedlichen Nitritmengen aufgetragen. Durch Steigerung der Nitritmenge lässt sich auch hier der Stoffumsatz verbessern. Bei den übrigen Analyten sind bereits bei 100 μ L die Ausgangsverbindungen nicht mehr nachweisbar und die Derivate erreichen >98 % der maximalen Peakfläche. Bei keiner der untersuchten Verbindungen wirkte sich eine zu ho-

he Nitrit-Konzentration nachteilig auf die Reaktion aus. Eine Abnahme der Peakflächen der Derivate wurde nicht beobachtet. Aus diesem Grunde wurden bei den in Kapitel 7.3 beschriebenen Versuchen 200 μL Natriumnitrit-Lösung (50 g/L) bei einem Probevolumen von 5 mL und 100 μL Iodwasserstoffsäure zugegeben, während in Kap. 7.4 bei 10 mL Probevolumen noch mit 500 μL Natriumnitrit-Lösung (10 g/L) gearbeitet wurde.

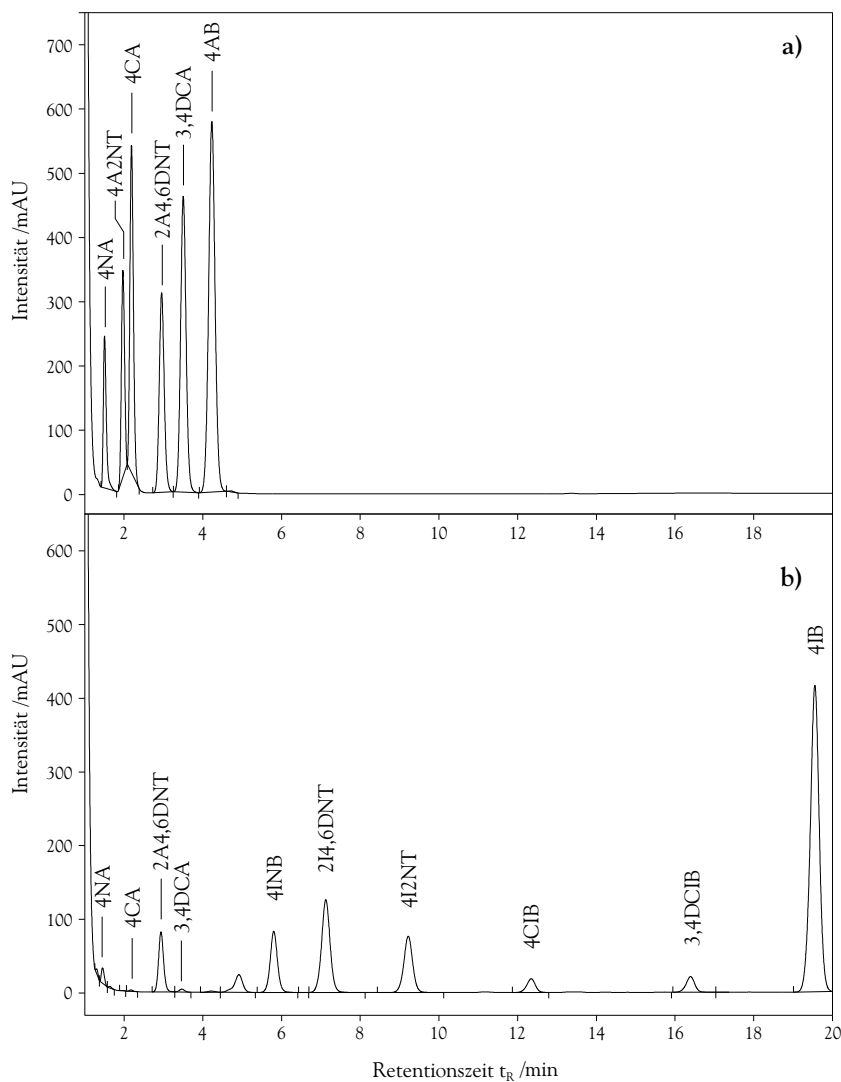


Abbildung 8: Einfluss der Nitrit-Menge auf die Derivatisierung. Dargestellt sind Chromatogramme nach Derivatisierung a) ohne und b) mit 50 μL NaNO₂-Lösung (50 g/L). Die Bestimmung erfolgte mit HPLC-UV bei 254 nm (vgl. Tab. 7). (4INB - 4-Iodnitrobenzol, 2I4,6DNT - 2-Iod-4,6-dinitrotoluol, 4I2NT - 4-Iod-2-nitrotoluol, 4CIB - 4-Chlor-iodbenzol, 3,4DCIB - 3,4-Dichlor-iodbenzol, 4IB - 4-Iodbiphenyl).

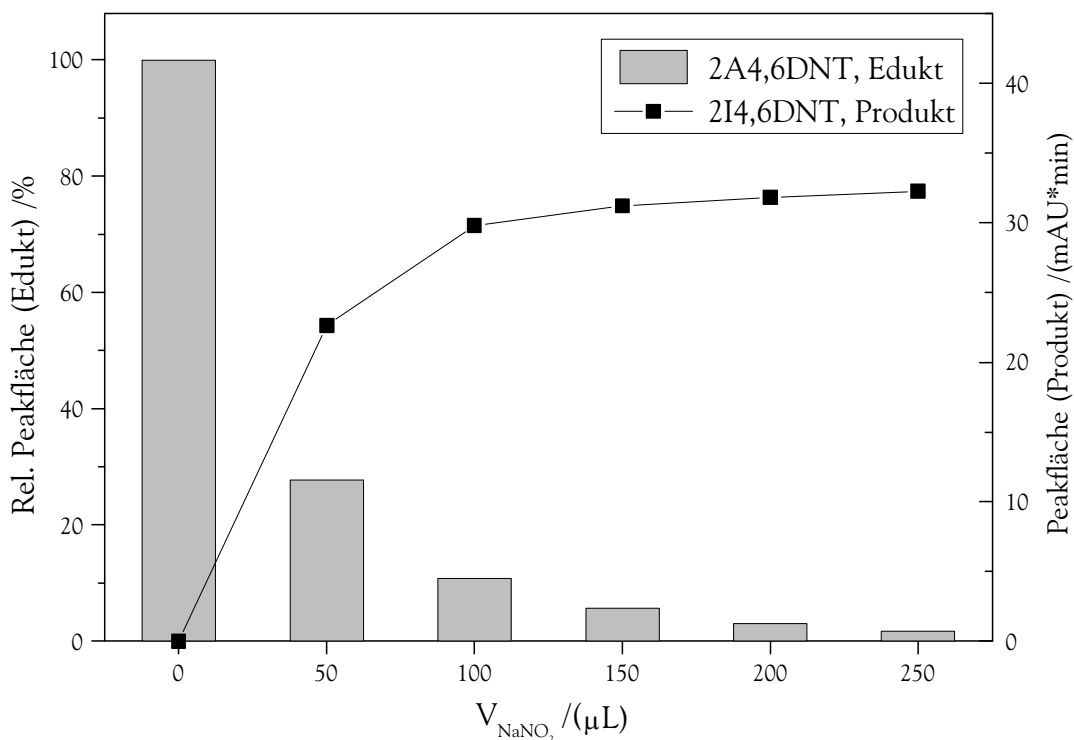


Abbildung 9: Einfluss der Nitritmenge auf den Stoffumsatz bei der Derivatisierung desaktivierter Verbindungen am Beispiel von 2A4,6DNT. 5 mL Probe 2A4,6DNT in einer Konzentration von mit 10 mg/L wurden mit 100 μL 55 %iger HI und 0 - 250 μL NaNO_2 -Lösung (50 g/L) derivatisiert. Die Peakflächen von Amin und Derivat wurden mit HPLC-UV bestimmt (vgl. Tab. 7).

7.1.4 Nebenreaktionen

Die Diazotierung mit anschließender Substitution durch Iodid ist als Reaktion bekannt, die mit guten bis sehr guten Ausbeuten verläuft [281]. Dennoch sind auch Nebenreaktionen bekannt: So kann die Diazoverbindung nicht nur durch Iodid sondern auch durch andere Nucleophile abgefangen werden. Dazu zählt auch die Reaktion mit Wasser beim Verkochen der Diazoniumionen.

Ausgehend von den in Tab. 32 auf Seite 167 aufgeführten Analyten in einer Konzentration von 1 mg/L, wurde eine Probe derivatisiert und mit 2 mL Essigsäureethylester extrahiert. Es wurde 1 μL des Extrakts injiziert und wie in Tab. 31 auf Seite 165 be-

schrieben mit GC-MS analysiert.

Die identifizierten Nebenprodukte traten durchweg nur in geringem Maße auf und sind in Tab. 8 mit ihrer Retentionszeit und Herkunft aufgeführt. Anhand ihrer Massenspektren und Retentionszeiten im Vergleich mit den entsprechenden iodierten Derivaten konnte eine Reihe von Phenolen und Methylphenylethern mit GC-MS nachgewiesen werden, die auf die Reaktion mit Wasser bzw. Methanol zurückzuführen sind. Es fällt auf, dass die beschriebenen Nebenprodukte weder für halogenierte noch für nitrosubstituierte Amine nachgewiesen werden konnten. Dies kann möglicherweise auf eine eingeschränkte GC-Tauglichkeit der Phenole zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es zwischen den einzelnen aromatischen Aminen deutliche Reaktivitätsunterschiede gibt (vgl. Kap. 7.1.3).

Die Methoxy-Substitution weist auf die Beteiligung des Methanols hin, das als Lösungsmittel für den zugesetzten Standard diente und in der Probe zu 10 % enthalten war. Deshalb wurde der Methanolgehalt für alle weiteren SPME-Experimente auf $\leq 0,1$ % reduziert, wodurch diese Nebenreaktion gänzlich an Bedeutung verlor.

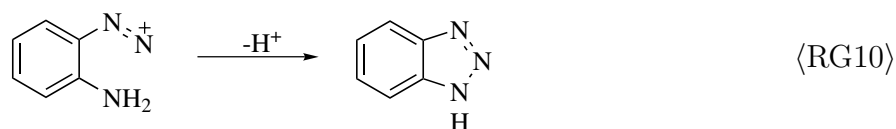
Darüber hinaus wurde die Reduktion der aromatischen Amine zu den entsprechenden Benzolen beobachtet. Es konnten zahlreiche Verbindungen wie Chlor-, Dichlor-, und Trichlorbenzol sowie 2- und 4-Nitrotoluol nachgewiesen werden (vgl. Tab. 8). Die Reduktion erfolgt in Gegenwart von Alkoholen und Ethern und wird durch Metallionen und Iodid katalysiert [282]. Dementsprechend wurden bei den SPME-Experimenten mit wesentlich geringeren Methanol-Zusätzen deutlich weniger Reduktionsprodukte gefunden. Hier waren neben 4-Nitrotoluol lediglich Dichlor- und Trichlorbenzol in Spuren nachweisbar. Dabei muss zudem bedacht werden, dass die chromatographischen Bedingungen nicht für die Untersuchung der Reduktionsprodukte unsubstituierter aromatischer Amine wie Benzol und Toluol geeignet sind.

Schwieriger ist die Derivatisierung von Diaminotoluolen, von denen besonders viele Nebenprodukte nachgewiesen wurden (vgl. Tab. 8). Die beiden Aminogruppen werden nacheinander derivatisiert, wie das Auftreten einfach iodierter Nebenprodukte belegt. Dabei aktiviert die verbleibende Aminogruppe die Diazo-Verbindung und begünstigt so Nebenreaktionen. Deshalb sind *meta*-Diamino-Verbindungen als besonders reaktiv

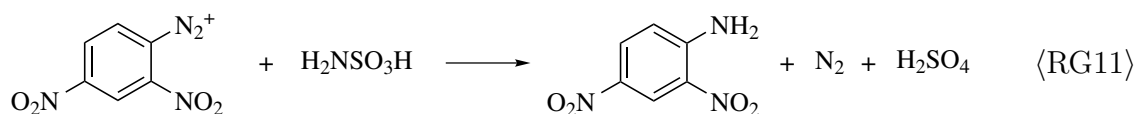
Tabelle 8: Übersicht über die mit GC-MS identifizierten Nebenprodukte der Derivatisierung ausgehend von den in Tab. 32 auf Seite 167 aufgeführten Analyten.

Substanz	Herkunft	t _R /min
Phenol	Anilin	7,88
Phenol-d5	Anilin-d5	7,87
Methylphenol	4AT	8,95
Hydroxynaphthalin	2NaA	13,59
Hydroxybiphenyl	2AB, 4AB	13,22 ; 16,38
Methoxybenzol	Anilin	7,32
Methoxybenzol-d5	Anilin-d5	7,31
Methoxytoluol	4AT	8,41
Methoxynaphthalin	2NaA	12,75
Methoxybiphenyl	2AB, 4AB	13,66 ; 15,77
Iodmethylphenol	2,4DAT, 2,6DAT	12,38 ; 12,43 ; 12,65
Iodmethoxytoluol	2,4DAT, 2,6DAT	11,76 ; 11,82
Dimethoxytoluol	2,4DAT, 2,6DAT	10,53
Methoxymethylphenol	2,4DAT, 2,6DAT	10,81
Dihydroxytoluol	2,4DAT, 2,6DAT	11,25
Chlorbenzol	4CA	6,39
Chlorfluorbenzol	3C4FA	6,74
Dichlorbenzol	3,4DCA	8,53
Trichlorbenzol	2,4,5TCA	9,82
2-Nitrotoluol	4A2NT, 2A6NT, 2,4DA6NT	10,35
4-Nitrotoluol	2A4NT	11,01

beschrieben [274]. Nicht derivatisieren lassen sich unter den gewählten Bedingungen *ortho*-Diamino-Verbindungen, die nach einfacher Diazotierung in einer intramolekularen Reaktion Benzotriazole bilden [274, 275].



Darüber hinaus kann auch Amidosulfonsäure anstelle von Iodid mit stark elektrophilen Diazoniumsalzen unter Rückbildung des Amins reagieren [283]. Während dies durch GC nicht belegt werden konnte, fiel 2A4,6DNT durch seinen besonders geringen Stoffumsatz auf (vgl. Kap. 7.1.3). Es bleibt zu klären, ob dieser einzig auf die geringe Reaktivität oder auf die Umsetzung mit überschüssiger Amidosulfonsäure zurückzuführen ist.



7.1.5 Stabilität der Derivate

Die Derivate wurden üblicherweise am gleichen oder am Tag nach der Derivatisierung bestimmt. Um das Verfahren flexibler zu machen, wurde untersucht, wie lange die Derivate stabil sind. Da bei wenig polaren Verbindungen häufig silanisierte Glasgeräte eingesetzt werden [136, 150, 284–286], wurden dabei neben unbehandelten auch silanisierte Vials verwendet, deren Oberfläche zuvor mit Dichlordimethylsilan modifiziert wurden (vgl. Kap. 10.4.2).

In silaniserten und normalen Vials wurden jeweils 12 Proben hergestellt. Dazu wurden in 17 mL Vials 5 mL Wasser gegeben, die mit den Analyten in einer Konzentration von 2,5 µg/L versetzt wurden. Alle Proben wurden, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, zusammen derivatisiert und der pH-Wert anschließend durch Zugabe von 100 µL 1 %iger Alizarinsulfonsäure und 1000 µL gesättigter NaAc-Lösung eingestellt. Unmittelbar nach der Derivatisierung wurden je 4 Proben untersucht, während die verbleibenden bei 4°C aufbewahrt wurden. Diese wurden nach 4 bzw. 15 Tagen analysiert. Die Bestimmung erfolgte mit GC-AED über die Iod-Spur I183 (vgl. Tab. 24 auf Seite 121), nachdem die Derivate bei 60°C 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert wurden. Für alle Proben wurde dieselbe PDMS/DVB-Faser verwendet.

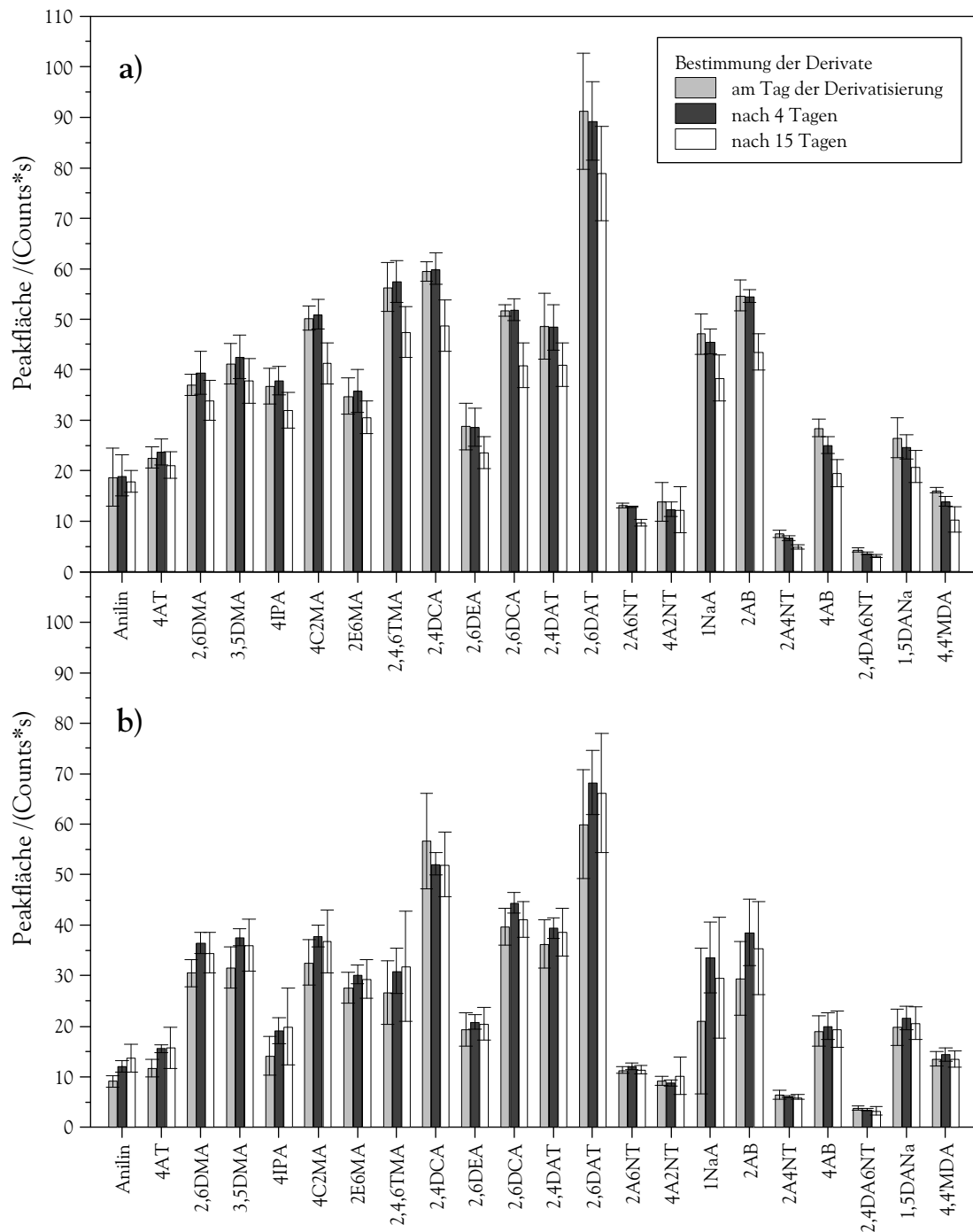


Abbildung 10: Stabilität der Derivate in a) silanisierten und b) normalen Vials nach 0, 4 und 15 Tagen bei 4°C. Dargestellt sind die mittleren Peakflächen ($n=4$) mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken. Die Proben wurden wie in Kap. 7.1.1 derivatisiert und der pH-Wert mit 1000 μL ges. NaAc-Lösung eingestellt. Nach 25 min Extraktion aus dem Headspace mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser bei 60°C wurden die Derivate mit GC-AED bestimmt.

Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Peakflächen verglichen. In Abb. 10 sind für die Analyten die Werte für silanisierte und normale Vials gegenübergestellt und die Standardabweichungen als Fehlerbalken aufgetragen. Während bei den normalen Vials keine Veränderung infolge der Lagerung zu beobachten ist, nehmen die Peakflächen bei den silanisierten Vials innerhalb von 15 Tagen durchschnittlich um 19,4 % ab. Die Unterschiede innerhalb der einzelnen Analyten bewegen sich zwischen 4,7 und 35,8 %. Während die früh eluierenden Derivate von alkylierten Aminen davon am wenigsten betroffen sind, beobachtet man den stärksten Rückgang für das Derivat von 4,4'MDA mit der größten Retentionszeit.

Ausgehend von den mittleren Peakflächen am Tag der Derivatisierung sind diese bei den normalen Vials im Mittel um 27,8 % geringer. Darin ist diese Beobachtung mit der Literatur vereinbar, in der die Silanisierung aufgrund der verbesserten Extrahierbarkeit eingesetzt wird [136, 150, 284–286]. Nach 15 Tagen beträgt dieser Unterschied jedoch nur noch 2,3 %. Da die Peakflächen innerhalb der beobachteten Zeit auf das Vergleichsniveau der normalen Vials zurückgehen, kommt als Erklärung eine allmähliche Hydrolyse der silanisierten Oberfläche in Frage. Durch die Umsetzung mit Dichlordimethylsilan entstehen Polysiloxane, die die Oberflächeneigenschaften aufgrund der Alkylgruppen verändern. Die Oberfläche fühlt sich deutlich glatter an und Wassertropfen perlen von ihr ab.

Demgegenüber ist die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serien bei den silanisierten Vials besser. Hier beträgt die durchschnittliche Relative Standardabweichung nur 10,1 %, wohingegen bei den normalen 18,3 % auftreten. Durch die Silanisierung lässt sich die Glasoberfläche homogener gestalten, auch wenn bei einigen Analyten wie 4IPA, 2,4,6TMA, 1NaA, 2AB und 2,4DA6NT hohe Relative Standardabweichungen auftraten.

Insgesamt belegen beide Versuchsreihen die Stabilität der iodierten Derivate. Die Verbindungen lassen sich auch nach längerer Zeit noch bestimmen. Da sich durch die Silanisierung eine bessere Reproduzierbarkeit erzielen lässt, wurden vor allen weiteren Experimenten die 17 mL Vials silanisiert. Der leichte Rückgang der Peakflächen störte nicht, da die Proben stets innerhalb weniger Tage untersucht wurden.

Bei den Experimenten in Kap. 7.4 wurde dagegen mit normalen Vials gearbeitet und

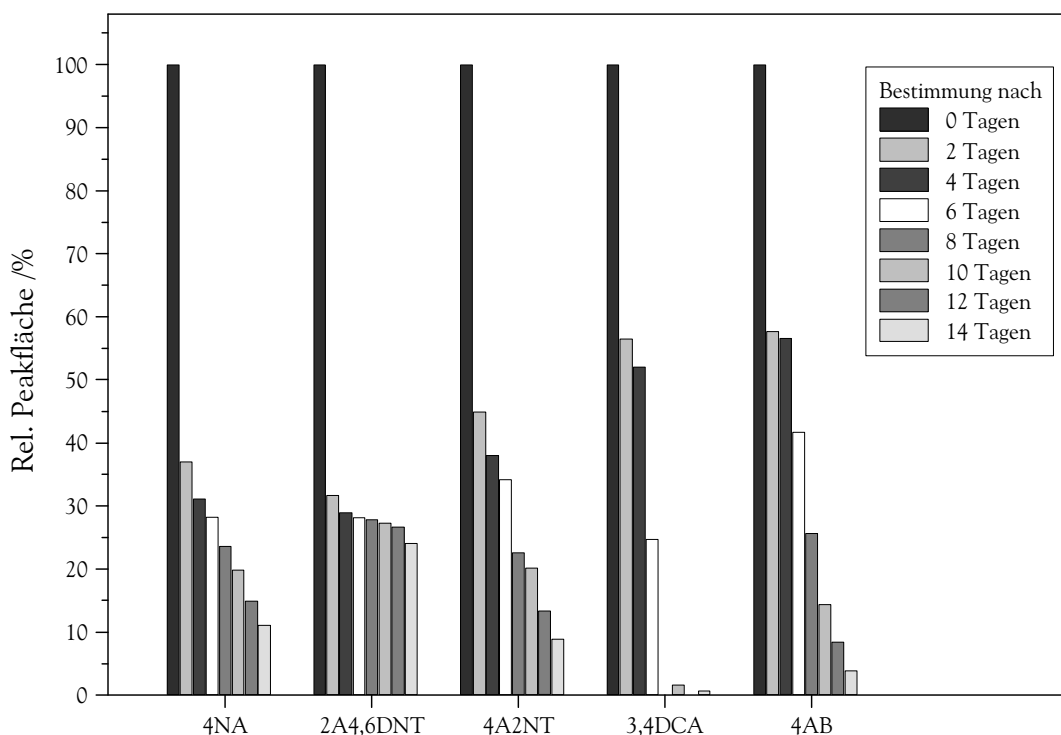


Abbildung 11: Stabilität der Derivate in NH_3 -Puffer. Die Probe wurde, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert und der pH-Wert mit 10 %igem NH_3 eingestellt. Nach Verdünnen wurden Aliquote nach 0 - 14 Tagen mit HPLC untersucht (vgl. Tab. 7).

der pH-Wert nach der Derivatisierung mit Natronlauge und Phosphat-Puffer auf $\text{pH} = 9$ eingestellt (vgl. Kap. 7.1.1). Die Peakflächen gingen unter den Bedingungen innerhalb weniger Tage drastisch zurück. Im folgenden wurde untersucht, inwieweit sich dies auf den verwendeten Puffer zurückführen lässt, und stattdessen der pH-Wert mit Ammoniak eingestellt.

Dazu wurde eine 5 mL Probe, die 4A2NT, 2A4,6DNT und 4NA in einer Konzentration von 10 mg/L und 3,4DCA sowie 4AB in einer Konzentration von 20 mg/L enthielt, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert und der pH-Wert durch Zugabe von 500 μl 10 %igem NH_3 auf $\text{pH} \approx 10$ eingestellt. Von der Probe wurden 2 mL mit Wasser auf 5 mL verdünnt, um ein Ausfallen der Derivate zu verhindern. Mit dieser Lösung wurde ein 1,5 mL HPLC-Vial befüllt. Die Probe wurde in regelmäßigen Abständen innerhalb von 14 Tagen 8x mit HPLC untersucht (vgl. Tab. 7 auf Seite 49).

In Abb. 11 sind die Relativen Peakflächen der Derivate bezogen auf den Ausgangswert

dargestellt. In allen Fällen ist ein rascher Rückgang der Peakflächen zu beobachten. Dieser fällt erheblich stärker aus als bei Verwendung des Acetat-Puffers. Es sind nur geringe Unterschiede zwischen den Analyten zu erkennen. Die nitrosubstituierten Verbindungen erweisen sich dabei als etwas stabiler als 3,4DCA und 4AB. Dies gilt insbesondere für 2A4,6DNT.

Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine chemische Reaktion handelt, da die Beobachtungen auch bei SPME bei erheblich geringeren Konzentrationen gemacht wurden (vgl. Kap. 7.4.3.1), so dass die Löslichkeit der Derivate als Erklärung ausscheidet. Ein derartiges Verhalten ist äußerst ungewöhnlich, gehen die aromatischen Iod-Verbindungen doch kaum Reaktionen ein. Denkbar wäre eine *ipso*-Substitution, bei der unter den alkalischen Bedingungen ein Phenol entstehen könnte. Hierfür sind allerdings bislang keinerlei Beispiele bekannt und die Reaktionsbedingungen für eine derartige Umwandlung wären sehr mild. Die mit der Desaktivierung der Analyten zurückgehende Reaktivität wäre allerdings mit einer solchen elektrophilen Reaktion vereinbar. Zum anderen wäre eine Oxidation der Derivate denkbar. Aromatische Iod-Verbindungen sind lichtempfindlich und werden teilweise mit Silber vor Oxidation geschützt. In jedem Fall scheint der pH-Wert eine entscheidende Rolle zu spielen, da bei Phosphat- wie Ammoniak-Puffer die Proben alkalisch waren, während beim Acetat-Puffer ein schwach saurer pH-Wert vorlag. Letztendlich lässt sich die zugrunde liegende Reaktion nicht klären, zudem sich keinerlei Reaktionsprodukte detektieren ließen. Bei den Versuchen in Kap. 7.4 wurden die Analyten deshalb direkt nach der Derivatisierung bestimmt. Da die Kalibrierung in gleicher Weise erfolgte, konnten abnehmende Peakflächen mit Hilfe eines Internen Standards kompensiert werden.

7.1.6 Polarität der Derivate

Über die Diazotierung lassen sich neben aromatischen Iodiden eine große Zahl weiterer Verbindungen herstellen. Um die Vorteile der Iodide im Kontext der Aufgabenstellung dieser Arbeit hervorzuheben, wurden die unterschiedlichen Produkte verglichen.

Ziel der Derivatisierung ist in dieser Arbeit die Verbesserung der Extrahierbarkeit durch Verringerung der Polarität der Analyten. Zu diesem Zweck wurden die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{OW} als Maß für die Polarität betrachtet. In Abb. 12 sind typische Derivate aromatischer Amine, die über die Diazotierung zugänglich sind, mit ihren $\log K_{OW}$ -Werten aufgeführt. Für alle Verbindungen ist verglichen mit der Aus-

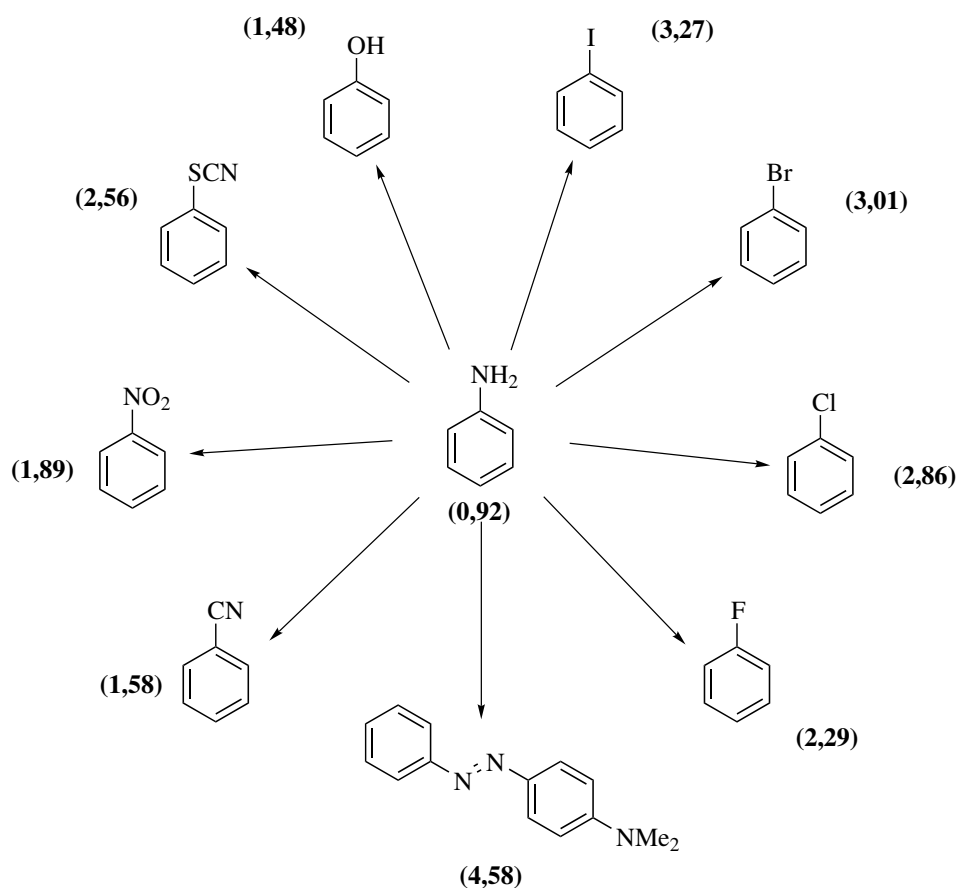


Abbildung 12: Gängige Derivate aromatischer Amine, die durch Diazotierung und anschließende Umsetzung zugänglich sind. Die in Klammern angegebenen $\log K_{OW}$ -Werte der Derivate wurden mit clogP von Daylight Chemical Information Systems (<http://www.daylight.com>) berechnet.

gangssubstanz eine Verminderung der Polarität verbunden. Diese ist jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt. In der Reihe der Halogenide nehmen die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten in der Reihenfolge $F < Cl < Br < I$ mit der Größe der Moleküle bedingt durch die Solvatation zu. Die am wenigsten polare Verbindung wird somit mit Iodid erreicht.

Wie Abb. 12 zeigt, sind die Derivate, die sich von den Pseudohalogeniden Cyanid und Thiocyanat sowie Nitrit ableiten, polarer als die entsprechenden Halogen-Verbindungen. Zwar sind die Phenole besonders einfach durch Verkochen der Diazoniumionen herzustellen, ihre Polarität ist jedoch kaum zur Verbesserung der Extrahierbarkeit geeignet.

Anders verhält es sich bei der Azokupplung, zu der es aktivierter Aromaten bedarf. Üblicherweise werden dazu Phenole, Phenoether oder aromatische Amine verwendet. Je nach eingesetzter Kupplungskomponente können dabei Verbindungen entstehen, die den Anforderungen dieser Arbeit gerecht werden. Zu beachten ist jedoch, dass in Abhängigkeit von der Kupplungskomponente auch *o/p*-Isomere gebildet werden. Zudem sind die Diazo-Verbindungen mangels thermischer Beständigkeit nicht für die Gaschromatographie geeignet. Demgegenüber eignen sie sich für die Flüssigchromatographie mit UV/Vis [268, 269] oder massenspektrometrischer Detektion [270].

Die Verminderung der Polarität der Analyten infolge der Umsetzung zu aromatischen Iodiden ist in Tab. 9 für verschiedene aromatische Amine gezeigt. Als Maß für die Polarität sind die logarithmischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ aufgeführt. Da für viele der iodierten Derivate keine experimentellen Werte verfügbar sind, wurden diese mit clogP berechnet. Die Gegenüberstellung der experimentellen mit den berechneten Werten zeigt eine gute Übereinstimmung mit einer durchschnittlichen Abweichung von 8,6 %.

Während sich die $\log K_{OW}$ -Werte der Amine im Bereich von 0,09 - 3,35 bewegen, betragen die der Derivate zwischen 3,01 und 5,28. Dies bedeutet eine starke Verschiebung der Verteilungskoeffizienten zu weniger polaren Verbindungen. Durchschnittlich nehmen diese infolge der Derivatisierung um 1,92 Größenordnungen je Aminogruppe zu. Am stärksten profitierten davon die polaren Diamino-Verbindungen. Während diese ohne Derivatisierung nur schwer zu extrahieren sind (vgl. Kap. 5.1), unterscheidet sich die

Tabelle 9: Logarithmische Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ aromatischer Amine und ihrer iodierten Derivate.

Analyt	log K_{OW} Amin		log K_{OW} Derivat	
	calc. ^a	exp.	calc. ^a	exp.
Anilin	0,92	/ 0,90 ^b	3,27	/ 3,25 ^j
4AT	1,41	/ 1,39 ^b	3,76	/ -
4CA	1,91	/ 1,91 ^f	3,98	/ 4,12 ^g
3,4DCA	2,60	/ 2,55 ^g	4,57	/ -
2,4,5TCA	3,35	/ 3,69 ^h	5,28	/ -
3C4FA	2,15	/ 2,06 ⁱ	4,12	/ -
2,4DAT	0,14	/ -	4,59	/ -
2,6DAT	0,09	/ -	4,29	/ -
2NaA	2,28	/ 2,28 ^b	4,44	/ -
2AB	2,80	/ 2,84 ^b	4,65	/ -
4AB	2,80	/ 2,88 ^b	5,15	/ -
4NA	1,26	/ 1,39 ^e	3,01	/ -
2A4NT	1,71	/ 1,87 ^c	3,21	/ -
2A6NT	1,63	/ -	3,13	/ -
4A2NT	1,68	/ -	3,43	/ -
2A4,6DNT	1,58	/ 1,85 ^d	2,87	/ -
4A2,6DNT	1,55	/ 2,10 ^d	3,09	/ -
2,4DA6NT	0,58	/ 0,79 ^d	4,25	/ -

^a berechnet mit clogP von Daylight Chemical Information Systems (<http://www.daylight.com>),
^b Ref. [287], ^c Ref. [288], ^d Ref. [289], ^e Ref. [290], ^f Ref. [291], ^g Ref. [292], ^h Ref. [293],
ⁱ Ref. [294], ^j Ref. [295].

Polarität der Derivate nicht von der der anderen Verbindungen. Nichtsdestotrotz ist eine Korrelation von extrahierter Stoffmenge und $\log K_{OW}$ -Werten nur für ausgewählte Analyten mit enger struktureller Verwandtschaft möglich [139, 140, 150]. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn Fasern auf der Basis von Divinylbenzen eingesetzt werden

und neben Verteilung auch Adsorption auftritt. Dennoch ist die klare Tendenz zu beobachten, dass polare Analyten schwieriger zu extrahieren sind, während die besten Ergebnisse mit weniger polaren erreicht werden. Aus diesem Grund beschäftigen sich viele der Arbeiten zur Festphasenmikroextraktion aromatischer Amine vornehmlich mit den weniger polaren Chloranilinen (vgl. Tab. 9).

7.1.7 Massenspektren der Derivate

Die Massenspektren der Derivate zeigen zumeist nur wenig Fragmentierung (vgl. Abb. 13 sowie Anhang 12.1 ab Seite 275). Charakteristisch ist ein intensiver Molpeak, der häufig zugleich der Basispeak ist. In den meisten Fällen geht die Fragmentierung von der Abspaltung von Iod aus und liefert ein typisches Fragment $[M-127]^+$. Dagegen ist das Iod-Signal der Masse 127 nur klein.

Eine Ausnahme bilden die Derivate von 2A6NT, 4A2NT, 2A4,6DNT, 4A2,6DNT und 2,4DA6NT. In Abb. 13 ist das Massenspektrum von 2-Iod-4,6-dinitrotoluol, dem Derivat von 2A4,6DNT, dargestellt. Der Molekülionenpeak ist hier nur wenig intensiv und der Basispeak um -17 m/z gegenüber den Molekülionenpeak verschoben. Die der Methylgruppe benachbarte Nitrogruppe führt bei diesen Verbindungen zum *ortho*-Effekt [296–298]. Infolge der Elektronenstoßionisation kommt es zu einer intramolekularen Reaktion,

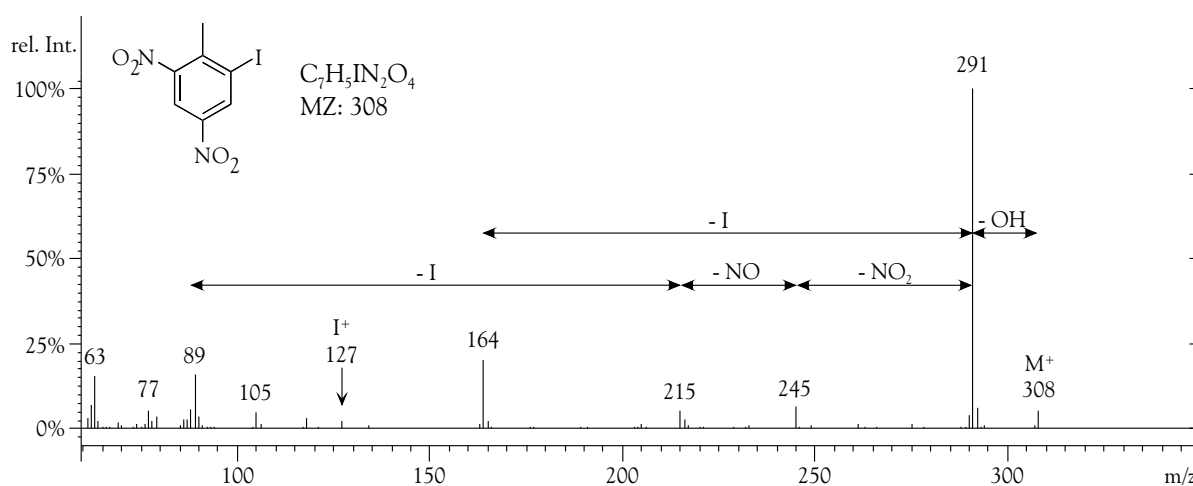


Abbildung 13: Massenspektrum von 2-Iod-4,6-dinitrotoluol, Derivat von 2-Amino-4,6-dinitrotoluol, registriert mit Varian Saturn 2000 (vgl. Tab. 34 auf Seite 171).

bei der durch Abspaltung eines OH-Radikals ein $[M-17]^+$ -Peak auftritt.

Durch die Derivatisierung ist die Molekülmasse um 111 m/z erhöht und damit außerhalb des Bereichs unspezifischer Fragmentierung. Dies ist besonders anschaulich in Abb. 14a) zu erkennen. Bei dem Agilent GC-MS wurde im Gegensatz zu den anderen beiden Geräten eine 60 m Säule verwendet, die höhere Elutionstemperaturen erfordert. Dies führt zu stärkerem Säulenbluten, welches das Rauschen in Abb. 14a) erklärt. Durch die

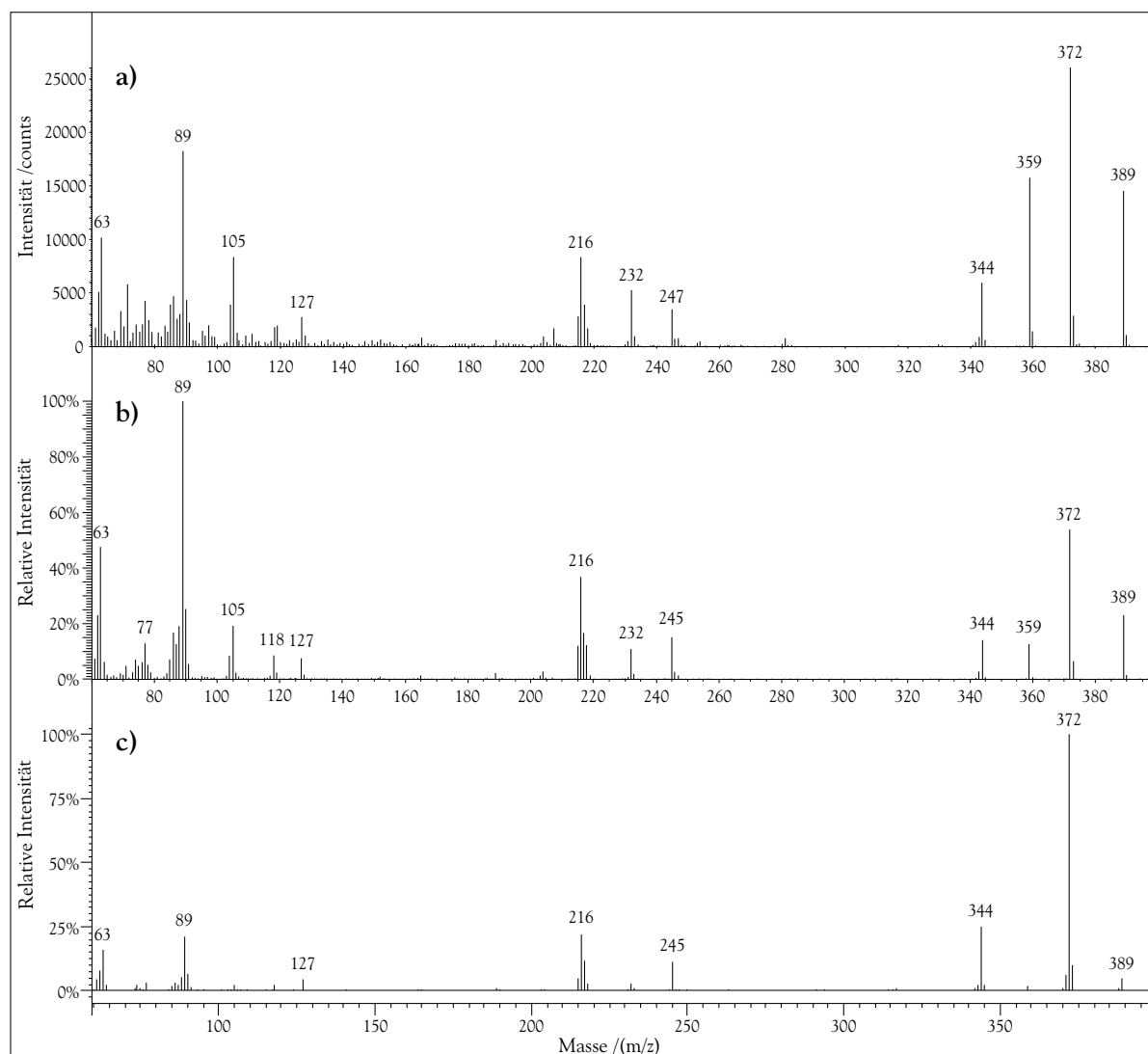


Abbildung 14: Vergleich der Massenspektren des Derivats von 2,4DA6NT (MZ: 389). Die Spektren wurden aufgenommen a) mit einem Agilent MSD 5973inert (vgl. Tab. 28 auf Seite 149), b) mit einem Finnigan Trace DSQ (vgl. Tab. 29 auf Seite 155) und c) einem Varian Saturn 2000 (vgl. Tab. 34 auf Seite 171).

höhere Masse der Derivate lassen sich die Verbindungen leichter ausfindig machen und aufgrund des besseren Signal/Rausch-Verhältnisses empfindlicher detektieren.

Viele der Derivate haben bislang noch keinen Eingang in die NIST Spektrenbibliothek gefunden. Aus diesem Grunde sind die Massenspektren der Derivate, die quantifiziert wurden, im Anhang aufgeführt. Die Spektren wurden mit einem Varian Saturn 2000 Massenspektrometer mit Ionenfalle unter den in Tab. 34 auf Seite 171 aufgeführten Bedingungen registriert. In einigen Fällen unterscheiden sie sich deutlich von den in der Literatur beschriebenen Spektren [175].

Um dies zu verdeutlichen wurden die Spektren, die mit zwei unterschiedlichen Quadrupol-Massenspektrometern sowie einer Ionenfalle unter typischen Bedingungen aufgezeichnet wurden, verglichen. In Abb. 14 ist das Massenspektrum von 2,4-Diiod-6-nitrotoluol, dem Derivat von 2,4DA6NT, gezeigt, bei dem ebenfalls der *ortho*-Effekt zu beobachten ist. In allen drei Fällen treten die gleichen Fragmente auf, jedoch unterscheiden sich die Intensitätsverhältnisse mitunter drastisch. Während bei den beiden Quadrupolgeräten die Intensitätsverhältnisse der charakteristischen Ionen weitgehend übereinstimmen, beobachtet man bei der Ionenfalle weit weniger Fragmentierung. Die Fragmentationen 389, 359 und 232 treten hier kaum hervor. Andererseits ist der *ortho*-Effekt bei der Ionenfalle von größerer Bedeutung und der Molekülionenpeak dementsprechend weniger ausgeprägt. Trotz nomineller 70 eV ist die Ionisierungsenergie bei dem Massenspektrometer mit Ionenfalle geringer als bei den anderen beiden Geräten und führt zu einer geringeren Fragmentierung. Hierbei spielt möglicherweise auch auf die jeweilige Bauform eine Rolle.

7.2 Bestimmung der extrahierten Stoffmenge

In Kap. 7.1.6 wurde postuliert, dass infolge der Derivatisierung die Extrahierbarkeit der Verbindungen verbessert wird. Die Argumentation stützt sich dabei auf die berechneten $\log K_{OW}$ -Werte, mangelt aber an experimentellen Daten, die dies untermauern. Deshalb sollten die extrahierten Stoffmengen nach SPME bestimmt werden. Im Gegensatz zur Flüssiginjektion ist bei SPME aufgrund der Verteilung zwischen Faser und wässriger Probe die aufgegebene Stoffmenge nicht bekannt. Deshalb behilft man sich in der Regel mit einer Kalibrierung durch Flüssiginjektion. Da es dazu der Referenzsubstanzen der Derivate bedarf, war diese Vorgehensweise in diesem Fall nicht möglich. Depletion-SPME erwies sich hierbei als Alternative. Die mehrfache Extraktion einer Probe zur Bestimmung der Extraktionsrate wurde in Kap. 7.2.1 für verschiedene Pestizide untersucht und in Kap. 7.2.3 auf die Derivate der in-situ Derivatisierung angewandt.

7.2.1 Untersuchung von depletion-SPME

Das depletion-SPME Modell, wie es in Kap. 4.2 hergeleitet wurde, wurde für 13 Pestizide unterschiedlicher Substanzklassen überprüft, die üblicherweise mittels GC bestimmt werden. Die Strukturen der Verbindungen sind in Abb. 15 aufgeführt. Die Verbindungen tragen zahlreiche verschiedene funktionelle Gruppen und decken einen weiten Bereich an Polaritäten ab, bezogen auf die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{OW} (vgl. Tab. 10).

Erste Tests wurden unternommen mit einer Lösung, die die Pestizide in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/L}$ enthielt. 13 mL wurden in eine 13 mL Rollrandflasche gegeben, so dass kein Headspace zu berücksichtigen war. Die mit Aluminiumfolie und Bördekkappe verschlossene Probe wurde 9x für je 20 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Extraktion erfolgte mittels Autosampler unter Agitation der Faser zur Durchmischung der Probe. In Anbetracht der kurzen Extraktionszeit erfolgte die Extraktion nicht unter Gleichgewichtsbedingungen. Nach jeder Extraktion wurden die Analyten von der Faser thermodesorbiert und mit GC-MS bestimmt. In Tab. 11 sind die dabei verwendete

Tabelle 10: Übersicht über die bei depletion-SPME untersuchten Verbindungen mit Stoffklasse, Summenformel, Molmasse und logarithmischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ sowie Retentionszeiten t_R und charakteristischen Fragmentionen unter den gewählten Bedingungen

Analyt	Stoffklasse	Summenformel	$\log K_{OW}$	t_R /min ^e	MM /(g/mol)	Fragmentionen /(m/z) ^d
Atrazin	Triazin	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	2,50 ^b	9,30	215,68	215, <u>200</u> , 172, 138
Ethofumesat	Benzofuran	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S	2,70 ^b	12,27	286,35	286, 241, <u>207</u> , 179, 161, 137
Fenpropimorph	Morpholin	C ₂₀ H ₃₃ NO	4,10 ^b	10,62	303,48	303, 145, <u>128</u>
Lindan (γ -HCH)	Organochlor	C ₆ H ₆ Cl ₆	3,72 ^a	9,25	290,83	219, 217, <u>183</u> , <u>181</u> , 111, 109
Parathion-ethyl	Organophosphor	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	3,83 ^a	12,63	291,26	<u>291</u> , 263, 235, 155, 139, 109
Pendimethalin	Nitroanilin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	5,18 ^b	12,81	281,31	282, <u>252</u> , 208, 162
Pirimicarb	Carbamat	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	1,70 ^b	10,37	238,29	238, <u>166</u> , 138, 72
Propazin	Triazin	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	2,93 ^a	9,41	229,71	229, <u>214</u> , 187, 172, 152
Prosulfocarb	Thiocarbamat	C ₁₄ H ₂₁ NOS	4,65 ^b	10,50	251,39	251, 218, <u>128</u> , 91
Sebutylazin	Triazin	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	2,85 ^c	10,02	229,71	230, 214, <u>200</u> , 214
Terbutryn	Triazin	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	3,74 ^a	10,93	241,36	242, <u>226</u> , 185, 170
Terbutylazin	Triazin	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	3,04 ^b	9,58	229,71	230, <u>214</u> , 172, 138
Trifluralin	Nitroanilin	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	5,34 ^a	9,48	335,28	336, <u>306</u> , 291, 264, 336

^a Ref. [131]; ^b Ref. [299]; ^c Ref. [300]; ^d der zur Quantifizierung verwendete Basispeak ist unterstrichen; ^e Bedingungen vgl. Tab. 11.

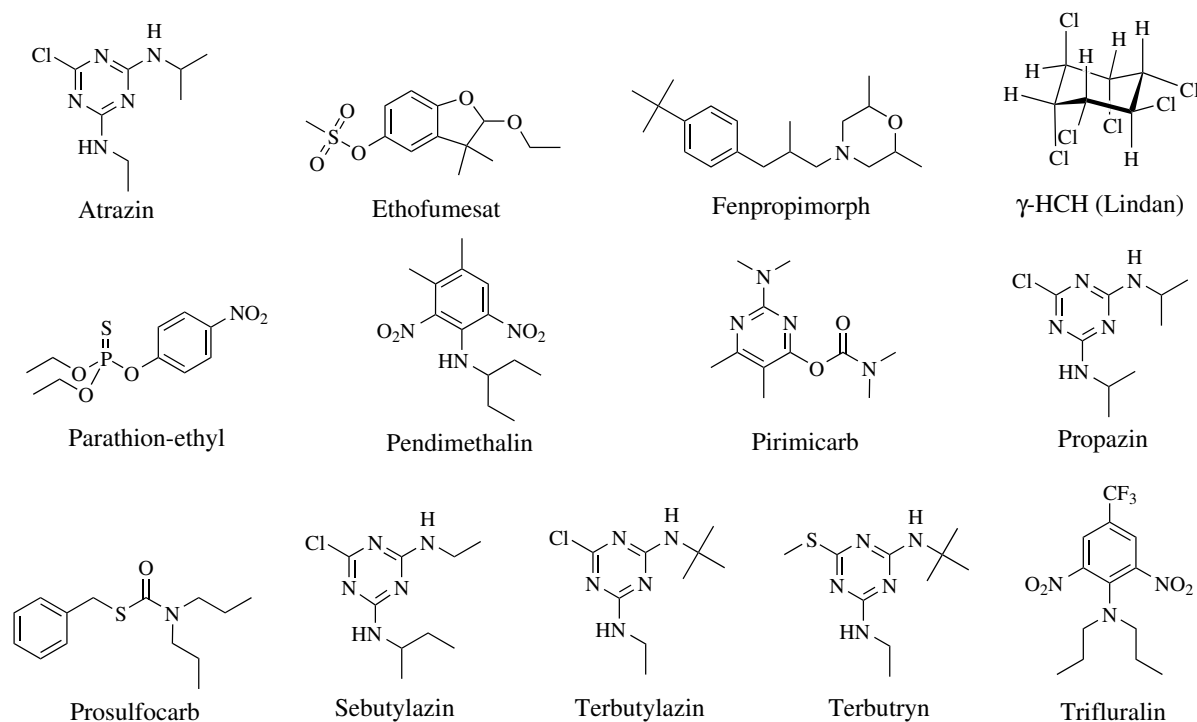


Abbildung 15: Strukturen der bei depletion-SPME verwendeten Pestizide

Tabelle 11: Parameter zur Trennung und Detektion der Pestizide bei depletion-SPME

Gerät	GC-MS Varian Star 3800 mit ion-trap Saturn 2000
Trennsäule	Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke
Injektor	PTV mit 0,8 mm SPME-Liner
Injektortemperatur	70°C für 0,2 min, mit 200°C/min auf 250°C heizen
Split	nach 3,6 min Splitventil öffnen (Verhältnis 1:20)
GC-Programm	40°C für 2,5 min, mit 50°C/min auf 160°C heizen, mit 10°C/min auf 200°C heizen und 2 min halten, mit 12°C/min auf 280°C, 0,43 min halten (Gesamtdauer: 18 min)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
Detektion	fullscan (60 - 350 m/z), EI mit 70 eV 40 μ A Emissionsstrom, 2250 V Multiplier-Spannung, Trap-, Transferline-, Manifold-Temperatur: 200°C, 280°C, 55°C

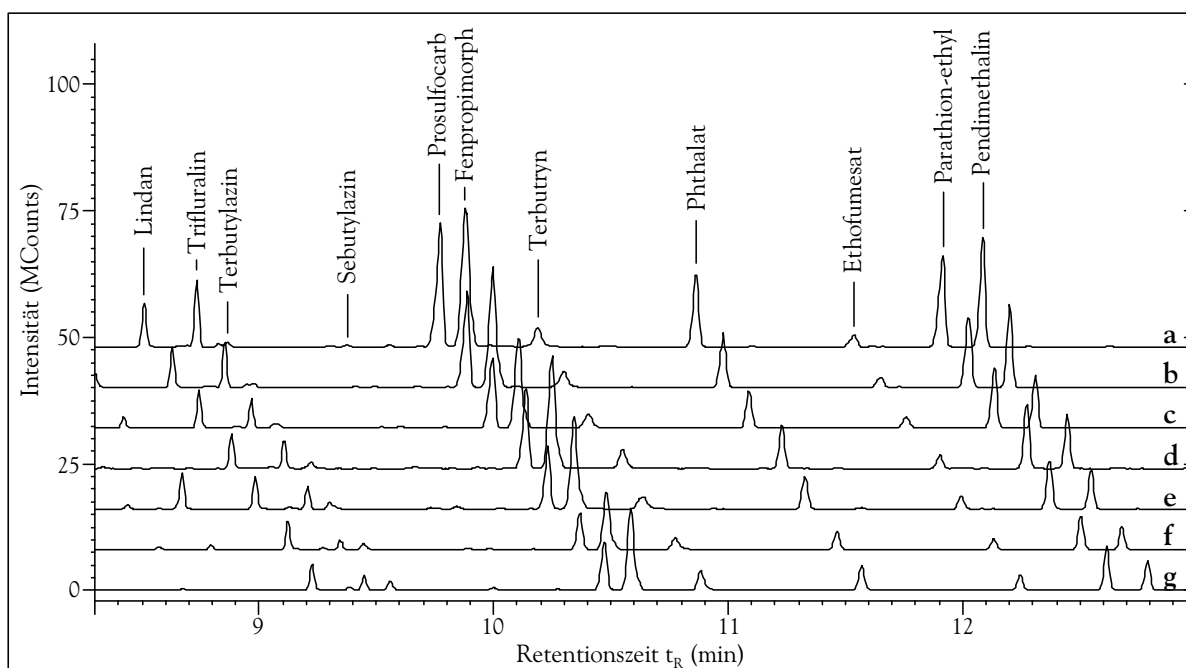


Abbildung 16: Chromatogramme einer Probe nach der ersten bis siebten Extraktion (a-g), die zu g) um $-0,12$ min und 8 MCOUNTS verschoben sind. Die Probe enthielt die Analyten in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/L}$ und wurde jeweils 20 min mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Bestimmung erfolgte mit GC-MS im fullscan-Modus.

ten Einstellungen zusammengefasst. Die Retentionszeiten der Pestizide sind zusammen mit den charakteristischen Fragmentationen in Tab. 10 aufgeführt. In Abb. 16 sind die Chromatogramme der ersten 7 Extraktionen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, wie die Peaks von Extraktion zu Extraktion kleiner werden. Darüber hinaus treten Unterschiede im Extraktionsverhalten der einzelnen Pestizide auf: Während beispielsweise zu Beginn der Peak von Trifluralin größer ist als der von Lindan, hat sich das Verhältnis nach 7 Extraktionen umgekehrt. Aufgrund der geringen Peakflächen sind Atrazin, Propazin und Pirimicarb in Abb. 16 nicht aufgeführt. Bei dem detektierten Phthalat handelt es sich um eine durch die Probenvorbereitung hervorgerufene Verunreinigung.

In gleicher Weise wurde eine Probe, die die Analyten in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/L}$ enthielt, 9x mit einer $100 \mu\text{m}$ PDMS-Faser für jeweils 20 min extrahiert. Auch hier war die beschriebene Abnahme der Peakflächen zu beobachten. In Abb. 17a sind die

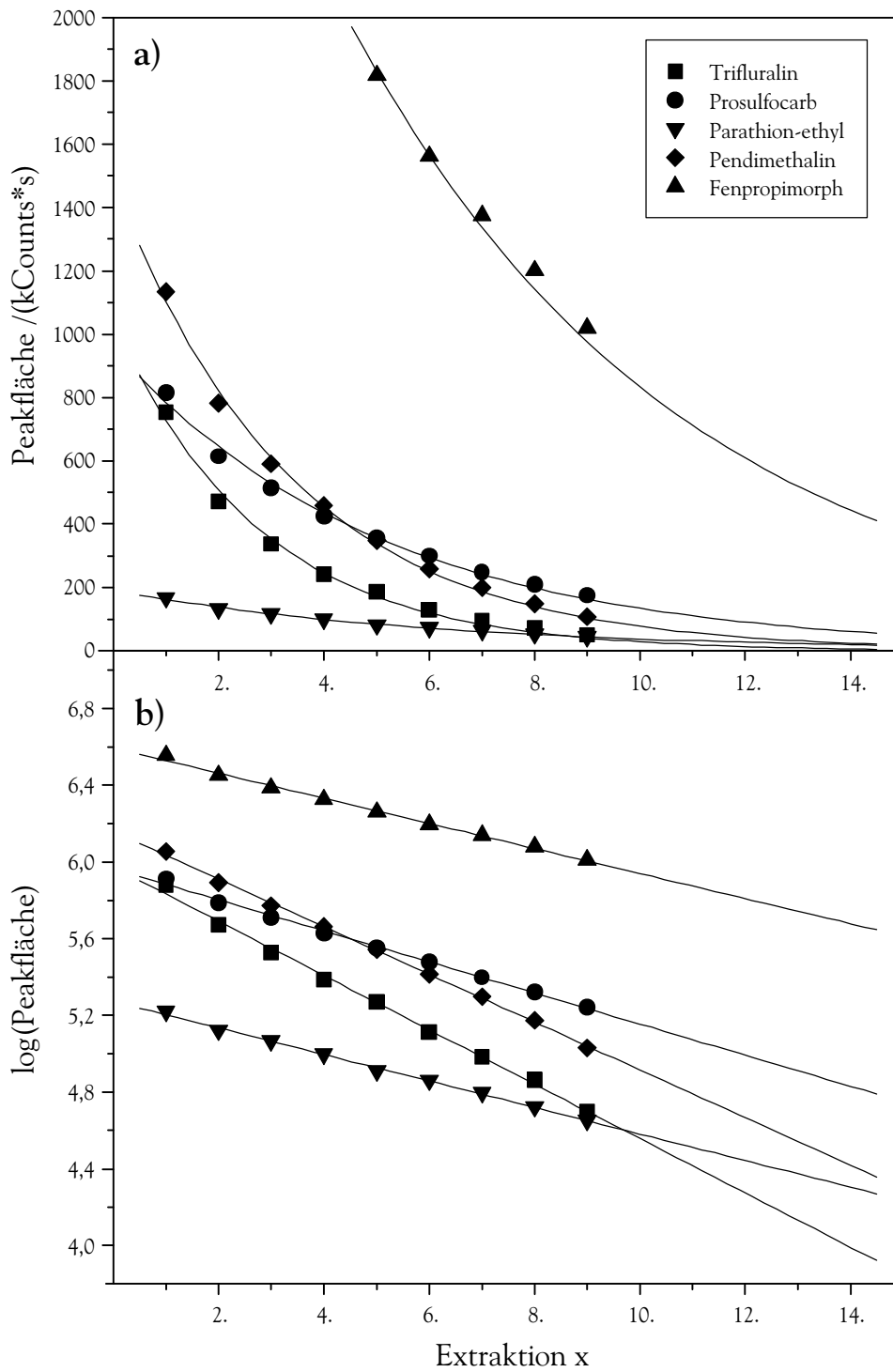


Abbildung 17: Mehrfache Extraktion einer Probe, die Analyten in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/L}$ enthielt, mit einer $100 \mu\text{m}$ PDMS-Faser für jeweils 20 min und Bestimmung der extrahierten Stoffmenge mit GC-MS. In a) sind die Peakflächen und in b) die logarithmischen Peakflächen gegen die Zahl der Extraktionen x aufgetragen. Der Fit erfolgte a) mit $f(x) = ab^x$ und b) mit $f(x) = a + bx$.

Tabelle 12: Extraktionsrate E , bei der ersten Extraktion angereicherte Stoffmenge $n_{f,1}$ und Korrelationskoeffizient R^2 nach mehrfacher Extraktion mit einer $100 \mu\text{m}$ PDMS-Faser

Analyt	Steigung	Extraktionsrate	Stoffmenge	R^2 ^c
	$\log(1-E)$ ^b	E /% ^{a,b}	$n_{f,1}$ /ng ^{a,d}	
Atrazin	-0,014	$3,2 \pm 1,8$	$0,4 \pm 0,2$	0,714
Ethofumesat	-0,047	$10,2 \pm 4,9$	$1,3 \pm 0,6$	0,767
Fenpropimorph	-0,065	$14,0 \pm 0,8$	$1,8 \pm 0,1$	0,995
Lindan (γ -HCH)	-0,027	$6,0 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,1$	0,975
Parathion-ethyl	-0,069	$14,7 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,1$	0,997
Pendimethalin	-0,124	$24,9 \pm 0,7$	$3,2 \pm 0,1$	0,999
Pirimicarb	-0,024	$5,4 \pm 2,0$	$0,7 \pm 0,3$	0,851
Propazin	-0,061	$13,0 \pm 5,4$	$1,7 \pm 0,7$	0,809
Prosulfocarb	-0,081	$17,0 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,1$	0,996
Sebutylazin	-0,023	$5,1 \pm 1,9$	$0,7 \pm 0,2$	0,846
Terbutryn	-0,066	$14,0 \pm 1,5$	$1,8 \pm 0,2$	0,983
Terbutylazin	-0,038	$8,4 \pm 3,2$	$1,1 \pm 0,4$	0,842
Trifluralin	-0,142	$27,8 \pm 1,2$	$3,6 \pm 0,2$	0,997

^a Vertrauensintervall für 95 % Wahrscheinlichkeit; ^b berechnet anhand der Ausgleichsgerade gemäß Gleichung (14); ^c Korrelationskoeffizient der Linearen Regression ; ^d aus E nach Gleichung (9); Ausgangskonzentration $c_0=1 \mu\text{g/L}$, Probenvolumen $V_s=13 \text{ mL}$, $n=9$ Extraktionen à 20 min.

Peakflächen einiger ausgewählter Analyten gegen die Nummer der Extraktion aufgetragen. Die Kurvenverläufe lassen deutlich die exponentielle Abnahme erkennen. Unter Verwendung der Fit-Funktion $f(x) = ab^x$ wurden die Ergebnisse gemäß Gleichung (13) analysiert. Dabei ist eine gute Übereinstimmung mit dem beschriebenen Modell zu beobachten.

Im Vergleich dazu lassen die logarithmischen Peakflächen Unterschiede zwischen einzelnen Analyten unmittelbar erkennen (vgl. Abb. 17b). Nach linearer Regression kann die Extraktionsrate E gemäß Gleichung (14) leicht aus der Steigung der Geraden $\log(1 - E)$ bestimmt werden. Die so berechneten Extraktionsraten sowie die zugehörigen

Steigungen der Geradengleichung der 13 Pestizide sind in Tab. 12 zusammengefasst. Bei 20minütiger Extraktion mit einer 100 μm PDMS-Faser bewegen sich die Extraktionsraten im Bereich von 3 bis 28 %. Dementsprechend sind die Unterschiede zwischen den Analyten groß: Während sich Analyten wie Atrazin, Sebutylazin und Pirimicarb in der Probe nur geringfügig abreichern, ist für Trifluralin und Pendimethalin eine drastische Abnahme zu beobachten. Nach 9 Extraktionen ist die Peakfläche auf weniger als 10 % der anfänglichen Peakfläche gesunken, wohingegen es bei ersteren Pestiziden lediglich ~ 70 % sind. Während die polarsten Analyten die niedrigsten Extraktionsraten aufweisen, beobachtet man mit zunehmenden $\log K_{\text{OW}}$ -Werten einen Trend zu höheren Extraktionsraten. Die mit der Abnahme der Polarität verbesserte Extrahierbarkeit wurde für Pestizide bereits früher beobachtet [137, 139, 140], wobei eine direkte Korrelation allenfalls für strukturell eng verwandte Verbindungen möglich zu sein scheint [140].

Unter Einbeziehung der Ausgangsstoffmenge $n_{\text{s},0}$ lassen sich gemäß Gleichung (9) die beim ersten Schritt extrahierten Stoffmengen berechnen. Diese bewegen sich entsprechend im Bereich von 0,4 bis 3,6 ng (vgl. Tab. 12).

7.2.2 Validierung des Verfahrens

Da die Bestimmung einer Extraktionsrate bereits mit lediglich 2 Extraktionen möglich ist, wurde der Einfluss der Zahl an Extraktionsschritten auf die Ergebnisse untersucht. Ausgehend von der o.g. Extraktion mit der PDMS-Faser wurden für die Auswertung 2 bis 9 Extraktionen herangezogen. Die Extraktionsraten wurden berechnet und gegen die Zahl an Extraktionsschritten aufgetragen, wie Abb. 18 an einigen Beispielen verdeutlicht. Während sich die Extraktionsrate anfangs stark ändert, beträgt die Änderung bei allen untersuchten Analyten nach 5 Extraktionsschritten weniger als 1 % der Extraktionsrate verglichen mit der vorhergehenden Extraktion. Darüber hinaus nehmen auch die Vertrauensintervalle, wie Abb. 18 zeigt, signifikant mit der Zahl an Teilschritten ab. Je nach Analyt genügen meist 5 Extraktionen, wohingegen bei den polaren Verbindungen mit zusätzlichen Extraktionen eine deutliche Verringerung der Vertrauensintervalle

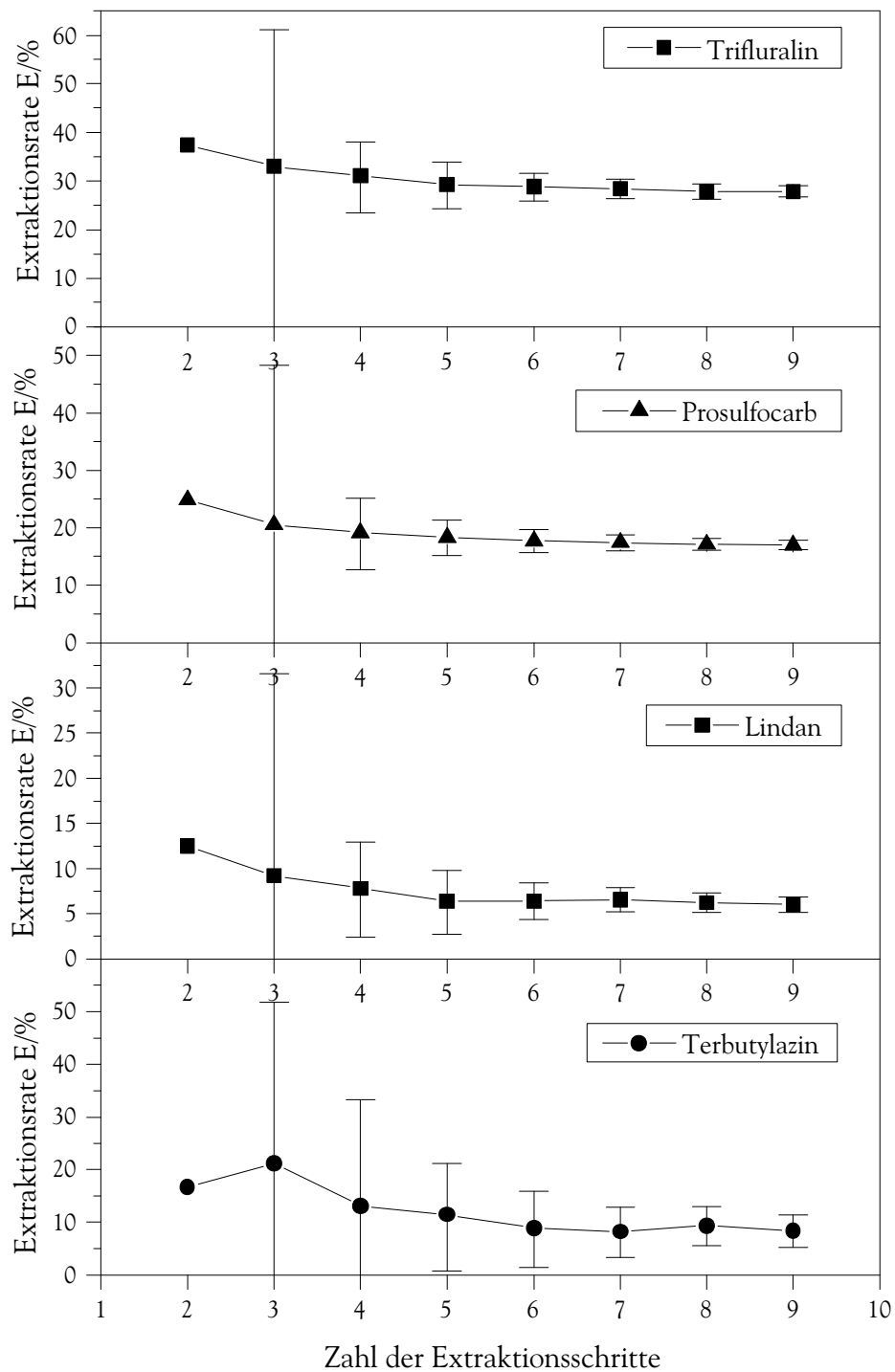


Abbildung 18: Einfluss der Zahl an Extraktionsschritten auf die Extraktionsrate E. Ausgehend von einer Analytkonzentration von $1 \mu\text{g/L}$ wurde mit einer $100 \mu\text{m}$ PDMS-Faser 9x für 20 min extrahiert. Für die Bestimmung der Extraktionsraten gemäß Gleichung (14) wurden 2 bis 9 Extraktionen herangezogen. Die Vertrauensintervalle für 95 %ige Wahrscheinlichkeit sind als Fehlerbalken dargestellt.

verbunden ist (vgl. Abb. 18).

Zum Vergleich lässt sich die Extraktionsrate E nach Gleichung (19) auch anhand des Peakflächenverhältnisses zweier aufeinander folgender Extraktionen bestimmen.

$$\frac{n_{f,x+1}}{n_{f,x}} = \frac{n_{s,0} \cdot E \cdot (1 - E)^{(x+1)-1}}{n_{s,0} \cdot E \cdot (1 - E)^{x-1}} = 1 - E \quad (19)$$

Bei mehrfacher Extraktion einer Probe ergibt sich die Extraktionsrate E dann aus dem Mittel der Peakflächenverhältnisse aller Extraktionen. Während dieser Ansatz deutlich einfacher ist, werden die experimentellen Ergebnisse durch die oben beschriebene Regression basierend auf der Summe der kleinsten Fehlerquadrate besser wiedergegeben.

Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der linearen Regression validiert. Die Residuen der Ausgleichsgeraden wurden bestimmt und zeigten eine Normalverteilung. Weiterhin war kein Trend zu erkennen, was die Richtigkeit des Modells weiter stützt. Die Korrelationskoeffizienten R^2 der linearen Regression wurden bestimmt und in Tab. 12 zusammengefasst. In Anbetracht der Einfachheit des zugrunde liegenden Modells wurden mit Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,97$ für die meisten Analyten sehr gute Resultate erzielt. Zudem ist die Extraktionszeit mit 20 min sehr kurz gewählt, so dass die Extraktion nicht unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgte und sich Schwankungen bzgl. Extraktionszeit, Extraktionstemperatur, Durchmischung der Probe etc. leicht bemerkbar machen können. Deutlich schwieriger war die Ausgleichsrechnung dagegen bei den Triazinen und Pirimicarb, wie Korrelationskoeffizienten R^2 zwischen 0,75 und 0,85 zeigen.

Die Qualität der Ergebnisse lässt sich mit dem Vertrauensintervall besser veranschaulichen. Dieses ist nach DOERFFEL [301] definiert als

$$\Delta b = s_b \cdot t(P, f) \quad (20)$$

mit der Standardabweichung der Steigung s_b und dem STUDENT t-Faktor für $f = n - 2$ Freiheitsgrade und $P = 95\%$ Wahrscheinlichkeit. Die Standardabweichung der Steigung s_b ist zugänglich über die Reststandardabweichung s_y und die Summe der Fehlerquadrate

$\sum(x - \bar{x})^2$, wobei \bar{x} die mittlere Zahl an Extraktionen ist.

$$s_b = \sqrt{\frac{s_y^2}{\sum(x - \bar{x})^2}} \quad (21)$$

Die berechneten Vertrauensintervalle sind in Tab. 12 für die Extraktionsrate und die extrahierten Stoffmengen angegeben. Für viele der untersuchten Analyten können die Extraktionsraten mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit auf ± 1 % angegeben werden. Andererseits bewegen sich die Vertrauensintervalle bei den Triazinen, Ethofumesat und Pirimicarb im Bereich von 1,8 bis 5,4 %. Die Steigungen der Regressionsgeraden sind für diese Analyten sehr klein, da sie nur in geringem Maße extrahiert werden. Derart kleine Steigungen lassen sich nur mit geringer Präzision und folglich vergleichsweise großen Vertrauensintervallen bestimmen. Zudem sind die Peakflächen der genannten Analyten klein, so dass sich das Rauschen stärker bemerkbar macht. Dies ist der Fall bei allen Analyten mit Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW} \leq 3$.

Die Reproduzierbarkeit der Methode zur Bestimmung der Extraktionsrate wurde anhand von 6 Proben überprüft. Dazu wurde eine Lösung verwendet, die die Analyten in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ enthielt. Jede der Proben wurde 6x für 20 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert und die extrahierte Stoffmenge mit GC-MS bestimmt. Dabei wurde für alle Experimente dieselbe SPME-Faser verwendet. Für jede Probe wurden die Extraktionsraten wie beschrieben über die lineare Regression der logarithmischen Peakflächen berechnet. Der Mittelwert sowie die Relativen Standardabweichungen RSD wurden gebildet und in Tab. 13 zusammengefasst. Für die weniger polaren Pestizide wurden Relative Standardabweichungen im Bereich von 4 - 25 % erhalten. Angesichts von nur 6 Extraktionen pro Probe wurde eine gute Übereinstimmung der einzelnen Messreihen gefunden. Wie bereits bei der Zahl der Extraktionen beschrieben, sind diese für die polaren Verbindungen weniger geeignet. Demzufolge wurden für die Triazine und Pirimicarb deutlich höhere Relative Standardabweichungen gefunden (vgl. Tab. 13). Eine derartige Zunahme der Relativen Standardabweichungen wurde auch von NARDI bei Abreicherungs experimenten mit in-tube SPME beobachtet [302].

Tabelle 13: Mittlere Extraktionsrate und Reproduzierbarkeit beim Vergleich mehrerer Proben und Extraktion mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser

Analyt	Mittlere Extraktionsrate	Reproduzierbarkeit
	E /% ^a	RSD /% ^a
Atrazin	2,2	92,7
Ethofumesat	4,4	24,6
Fenpropimorph	16,7	15,2
Lindan (γ -HCH)	10,8	3,9
Parathion-ethyl	26,6	7,5
Pendimethalin	23,9	11,9
Pirimicarb	3,2	91,8
Propazin	5,9	47,5
Prosulfocarb	21,8	9,0
Sebuthylazin	4,2	43,9
Terbutryn	10,9	24,8
Terbutylazin	7,3	34,9
Trifluralin	26,3	7,6

^a 6 Proben mit je $x=6$ Extraktionen à 20 min, Ausgangskonzentration $c_0=1 \mu\text{g/L}$, Probenvolumen $V_s=13 \text{ mL}$.

Ein weiterer interessanter Aspekt wurde bislang noch nicht angesprochen: Das Modell ist nur gültig, solange bei jeder Konzentration im untersuchten Bereich die extrahierte Stoffmenge proportional der Menge in der wässrigen Lösung ist. Zu Abweichungen kann es kommen, wenn die Extraktion nicht ausschließlich auf Verteilung beruht, sondern auch Adsorption auftritt. Da die Zahl der Sorptionsplätze begrenzt ist, wird mit zunehmender Konzentration eine Abweichung von der Linearität beobachtet, die in einer Sättigung endet (vgl. Abb. 19). Während bei geringen Konzentrationen die extrahierte Stoffmenge proportional zur Stoffmenge in der Probe ist (HENRY-Isotherme), lässt sich der Verlauf bei höheren Konzentrationen mit der LANGMUIR-Isotherme wiedergeben. Das Modell der depletion-SPME ist bei Auftreten von Adsorption nur für gerin-

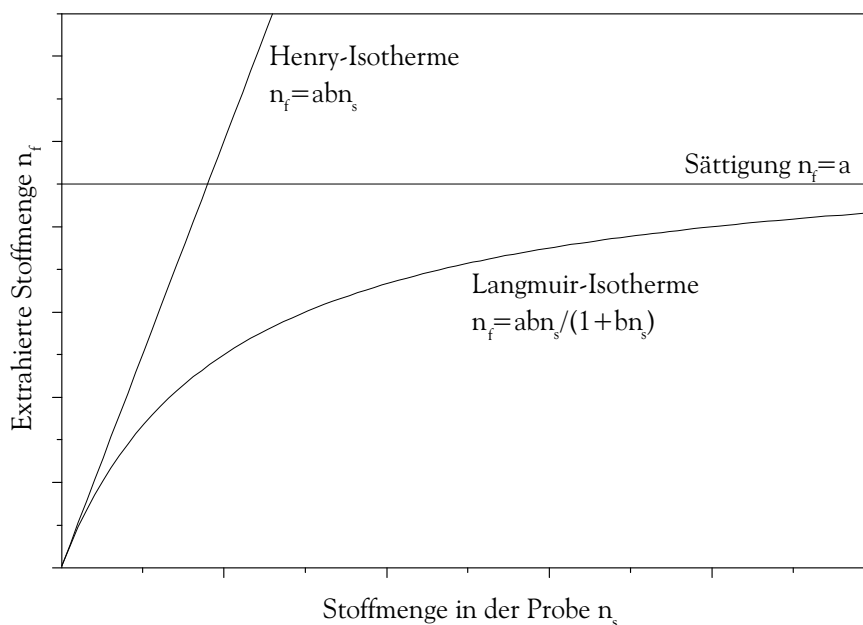


Abbildung 19: Verlauf der extrahierten Stoffmenge n_f als Funktion der Stoffmenge in der Probe n_s bei Extraktion basierend auf Adsorption. Die Sättigungsmenge a und die Konstante b sind charakteristische Parameter.

ge Konzentrationen zulässig. Adsorptive Eigenschaften werden Fasern mit eingelagerten porösen DVB-Partikeln wie PDMS/DVB, CW/DVB, DVB/Car/PDMS und Car/PDMS zugeschrieben, wohingegen PA und PDMS ausschließlich auf Verteilung basieren.

Um dies zu überprüfen, wurden die Extraktionsraten der PDMS/DVB-Faser bei konstantem Probevolumen $V_s = 13$ mL für unterschiedliche Konzentrationen bestimmt. Ausgehend von 4 Proben, die die Analyten in Konzentrationen von $0,1 \mu\text{g/L}$, $1 \mu\text{g/L}$, $10 \mu\text{g/L}$ bzw. $100 \mu\text{g/L}$ enthielten, wurde je 8x für 20 min mit derselben $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die extrahierten Stoffmengen wurden mit GC-MS bestimmt und die Extraktionsraten anhand der Geradengleichung gemäß Gleichung (14) berechnet. Für die einzelnen Konzentrationen sind die Extraktionsraten mit den Vertrauensintervallen in Tab. 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Einfluss der Analytkonzentration auf die Extraktionsrate bei mehrfacher Extraktion mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser

Analyt	Extraktionsrate E /% ^{a,b}			
	$c_0 = 0,1 \mu\text{g/L}$	$c_0 = 1 \mu\text{g/L}$	$c_0 = 10 \mu\text{g/L}$	$c_0 = 100 \mu\text{g/L}$
Atrazin	$2,1 \pm 7,0$	$0,9 \pm 2,8$	$0,5 \pm 2,2$	$-7,0 \pm 6,3$
Ethofumesat	$7,9 \pm 5,4$	$4,7 \pm 3,5$	$3,1 \pm 1,8$	$0,5 \pm 1,3$
Fenpropimorph	$18,8 \pm 1,0$	$13,7 \pm 4,9$	$16,5 \pm 4,1$	$9,2 \pm 3,8$
Lindan (γ -HCH)	$13,0 \pm 1,0$	$10,9 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,5$	$5,4 \pm 1,2$
Parathion-ethyl	$22,6 \pm 4,5$	$23,7 \pm 4,6$	$23,4 \pm 2,3$	$9,4 \pm 0,1$
Pendimethalin	$32,0 \pm 0,8$	$21,5 \pm 4,2$	$11,1 \pm 3,3$	$-8,4 \pm 6,1$
Pirimicarb	$4,7 \pm 25,7$	$6,8 \pm 5,4$	$1,5 \pm 2,5$	$-3,0 \pm 1,6$
Propazin	$8,9 \pm 5,9$	$7,5 \pm 4,4$	$1,3 \pm 2,5$	$12,1 \pm 21,0$
Prosulfocarb	$25,8 \pm 1,7$	$19,6 \pm 5,5$	$22,0 \pm 3,2$	$-6,0 \pm 11,8$
Sebutylazin	$4,2 \pm 5,0$	$2,0 \pm 2,5$	$2,1 \pm 1,6$	$-1,2 \pm 1,6$
Terbutryn	$16,3 \pm 6,6$	$7,9 \pm 3,2$	$5,8 \pm 2,1$	$3,7 \pm 3,6$
Terbutylazin	$15,7 \pm 6,7$	$4,8 \pm 4,5$	$3,6 \pm 2,2$	$-42,7 \pm 14,5$
Trifluralin	$35,7 \pm 3,7$	$24,3 \pm 5,3$	$25,7 \pm 3,8$	$8,4 \pm 5,7$

^a Probevolumen $V_s = 13 \text{ mL}$, 20 min Extraktion mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser, $x = 8$ Extraktionen; ^b Vertrauensintervalle für 95 %ige Wahrscheinlichkeit.

Mit zunehmender Konzentration beobachtet man im Bereich von 0,1 - 10 $\mu\text{g/L}$ für die weniger polaren Verbindungen nur einen leichten Rückgang der Extraktionsraten (vgl. auch Abb. 20). Dieser Effekt lässt sich mit dem beschriebenen Adsorptionsmechanismus und der begrenzten Zahl an Sorptionsstellen erklären. Da die Experimente beginnend mit geringsten Konzentration durchgeführt wurden, kann ein Verlust an Faserkapazität als Erklärung nicht ausgeschlossen werden. Dieser sollte sich jedoch bei allen Verbindungen gleichermaßen bemerkbar machen. Unter Berücksichtigung der Vertrauensintervalle ist dieser Effekt bei Trifluralin und Pendimethalin besonders ausgeprägt, bei denen für 0,1 $\mu\text{g/L}$ deutlich höhere Extraktionsraten gefunden wurden. Da es sich hierbei um die beiden Analyten mit den höchsten Extraktionsraten handelt, wäre es schlüssig, dass

diese auch von der Adsorption am stärksten beeinflusst werden.

Bei den Triazinen und Pirimicarb findet man für niedrige Konzentrationen ebenfalls deutlich höhere Extraktionsraten. In diesem Fall sind die extrahierten Stoffmengen zu gering für eine präzise Bestimmung wie die großen Vertrauensintervalle erkennen lassen. Mit zunehmender Konzentration nehmen diese auf das Niveau der weniger polaren Verbindungen ab und gestatten eine präzise Bestimmung der Extraktionsraten.

Bei 100 $\mu\text{g/L}$ überschreiten die Analyten die Kapazität der Faser sowie der Ionenfalle, wie eine verminderte Fragmentierung und die Bildung von $[M+1]^+$ -Peaks belegen. Infolge der Sättigung der PDMS/DVB-Faser weisen zahlreiche Analyten viel geringere Extrak-

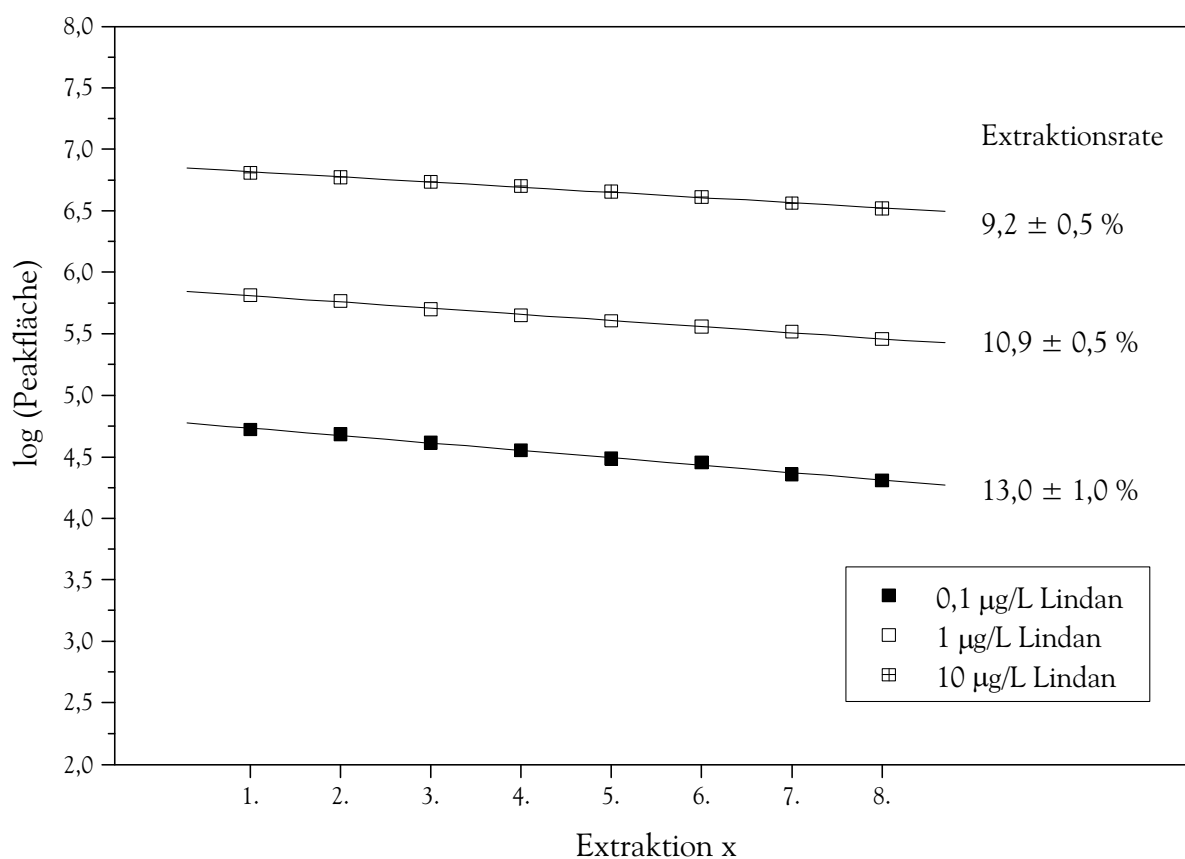


Abbildung 20: Einfluss der Analytkonzentration auf die Extraktionsrate von Lindan. Die Proben mit Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, und 10 $\mu\text{g/L}$ wurden je 8x für 20 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die logarithmischen Peakflächen wurden gegen die Extraktion aufgetragen und die Ausgleichsgerade gemäß Gleichung (14) bestimmt.

tionsraten auf. Innerhalb eines Abreicherungs-experiments nehmen die Peakflächen der stärker polaren Verbindungen aufgrund kompetitiver Effekte sogar zu. Während zu Beginn die Faser vorwiegend durch die unpolaren Verbindungen gesättigt ist, werden die polaren Verbindungen mit zunehmender Abreicherung ersterer in stärkerem Maße extrahiert.

Abschließend sollte die depletion-SPME mit Flüssiginjektion zur Bestimmung der extrahierten Stoffmenge verglichen werden. Dazu war es notwendig, die Injektionsbedingungen der Flüssiginjektion an die SPME anzupassen. So ist beispielsweise der für SPME verwendete 0,8 mm Insert-Liner je nach Lösungsmittel und Temperatur unter isothermen Bedingungen nur für ein Injektionsvolumen von etwa 0,1 μL geeignet [142, 303]. Das Abmessen derart kleiner Volumina ist jedoch schwierig. Aus diesem Grunde wurden die Injektionsbedingungen durch Verwendung eines PTV-Programms so weit angepasst, dass 1 μL der methanolischen Standards aufgegeben werden konnte (vgl. Tab. 11 auf Seite 68).

Zur Kalibrierung des chromatographischen Systems wurden 4 Standardlösungen verwendet, die die Analyten in Konzentrationen von 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L bzw. 5,0 mg/L enthielten. Zwischen den depletion-SPME Messreihen wurde die Kalibrierung mehrfach wiederholt, ohne dass signifikante Änderungen der Empfindlichkeit auftraten. Dazu wurden 4 Proben mit einem Volumen von 13 mL 8x bzw. 9x mit verschiedenen SPME-Fasern für je 20 min extrahiert und die angereicherten Analyten unter gleichen chromatographischen Bedingungen analysiert. Die verwendeten SPME-Fasern waren 100 μm PDMS, 85 μm PA, 70 μm CW/DVB und 65 μm PDMS/DVB. Anhand der logarithmischen Peakflächen wurden die Extraktionsraten gemäß Gleichung (14) berechnet. Unter Einbeziehung der Ausgangskonzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ wurden die in Tab. 15 zusammengestellten Stoffmengen für die erste Extraktion bestimmt. Zum anderen wurden die Stoffmengen mit Hilfe der Kalibrierdaten der Flüssiginjektion für die erste Extraktion ermittelt (vgl. Tab. 15).

Tabelle 15: Vergleich verschiedener SPME-Fasern und Bestimmung der extrahierten Stoffmenge mittels depletion-SPME und Kalibrierung mit Flüssigstandards

Analyt	Extrahierte Stoffmenge $n_{f,1}$ /ng ^a							
	PDMS ^b		PA ^c		CW/DVB ^d		PDMS/DVB ^e	
	SPME ^f	Injek. ^h	SPME ^f	Injek. ^h	SPME ^f	Injek. ^h	SPME ^g	Injek. ^h
Ethofumesat	1,3	0,2	0,5	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6
Fenpropimorph	1,8	1,6	0,5	0,2	0,6	0,3	1,8	2,0
Lindan (γ -HCH)	0,8	0,6	1,2	1,4	0,6	0,5	1,4	2,4
Parathion-ethyl	1,9	0,8	2,1	1,1	2,1	0,6	3,1	1,8
Pendimethalin	3,2	3,2	2,1	2,0	2,5	1,5	2,8	3,4
Prosulfocarb	2,2	1,8	1,4	1,2	1,5	1,0	2,6	2,8
Terbutryn	1,8	0,6	0,9	0,5	1,2	0,6	1,0	1,1
Trifluralin	3,6	2,0	2,1	0,7	2,5	0,9	3,2	2,0

^a Ausgangskonzentration $c_0=1$ $\mu\text{g/L}$, Probevolumen $V_s=13$ mL, 20 min Extraktion; ^b 100 μm PDMS; ^c 85 μm PA; ^d 70 μm CW/DVB; ^e 65 μm PDMS/DVB; ^f $n=9$ Extraktionen; ^g $n=8$ Extraktionen; ^h 4-Punkt-Kalibrierung mit Flüssigstandards entsprechend 0,1 - 0,5 ng jedes Analyten.

Beim Vergleich der verschiedenen Fasern beobachtet man für PDMS und PDMS/DVB ähnliche Ergebnisse. Im Gegensatz dazu sind die extrahierten Stoffmengen der PA- und der CW/DVB-Faser geringer. Die beste Übereinstimmung zwischen depletion-SPME und Flüssiginjektion tritt für die PDMS/DVB-Faser auf, während bei den anderen einzelne Analyten deutliche Abweichungen zeigen. Diese sind insbesondere zu beobachten, wenn die extrahierten Stoffmengen gering sind. Die größten Differenzen werden für die CW/DVB-Faser festgestellt, die zugleich die geringsten extrahierten Stoffmengen aufweist. Demgegenüber beträgt die Abweichung zwischen depletion-SPME und Flüssiginjektion bei PDMS/DVB mit deutlich besseren Extraktionsraten lediglich 21 %.

Die für die depletion-SPME erzielten Resultate stimmen mit einer mittleren Abweichung von 35 % über alle Analyten gut mit der Flüssiginjektion überein. Durch Verwendung des PTV-Programms sind die Ergebnisse trotz des großen Injektionsvolumens

in Verbindung mit dem 0,8 mm Insert-Liner vergleichbar. Es ist kein Tailing zu beobachten und die Analyten zeigen ähnliche chromatographische Eigenschaften. Die Verdampfung des Lösungsmittels im Injektor erfolgt langsam, ohne dass die Kapazität des Insert-Liners überschritten wird. Die mit depletion-SPME bestimmten Stoffmengen sind zumeist größer als bei Flüssiginjektion. Diese Beobachtung ist vermutlich auf einen Volumenfehler bei der Flüssiginjektion zurückzuführen.

7.2.3 Bestimmung der extrahierten Stoffmenge nach Derivatisierung

Zur Beurteilung der Extrahierbarkeit der Derivate bedarf es der Verteilungskoeffizienten der Extraktion. Diese wurden mittels depletion-SPME bestimmt. Dazu wurde eine Probe, die 18 aromatische Amine in einer Konzentration von 0,5 µg/L enthielt, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert. Anschließend wurde die Probe 9x für 30 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Nach jeder Extraktion wurden die auf der Faser angereicherten Derivate mittels GC-MS bestimmt. Die Parameter für Extraktion, Trennung und Bestimmung der Verbindungen sind in den Tab. 36, 31 und 34 auf den Seiten 175, 165 bzw. 171 zusammengefasst. Die Auswertung erfolgte analog der Pestizide über die logarithmischen Peakflächen (vgl. Kap. 7.2.1). Für einige Analyten sind diese in Abb. 21 gegen die Extraktion x aufgetragen. Gemäß Gleichung (14) wurden Ausgleichsgeraden berechnet. Diese stimmen auch hier sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen überein. Während ein Großteil der Verbindungen recht ähnliche Steigungen aufweist, wurden für die nitrosubstituierten Analyten deutlich geringere Steigungen beobachtet (vgl. Abb. 21).

Dies ist auch bei den Extraktionsraten zu sehen, die aus den Steigungen gemäß Gleichung (14) berechnet wurden. Zusammen mit den Vertrauensintervallen sind diese in Tab. 16 aufgeführt. Während die Verbindungen ohne Nitrogruppen durchschnittlich eine Extraktionsrate von 27,1 % aufweisen, beträgt sie bei den nitrierten 18,1 % und bei den dinitrierten nur noch 12,5 %. Beim Vergleich mit den Pestiziden wird die sehr gute Extrahierbarkeit der Derivate deutlich: Mit einer Extraktionsrate von durchschnittlich

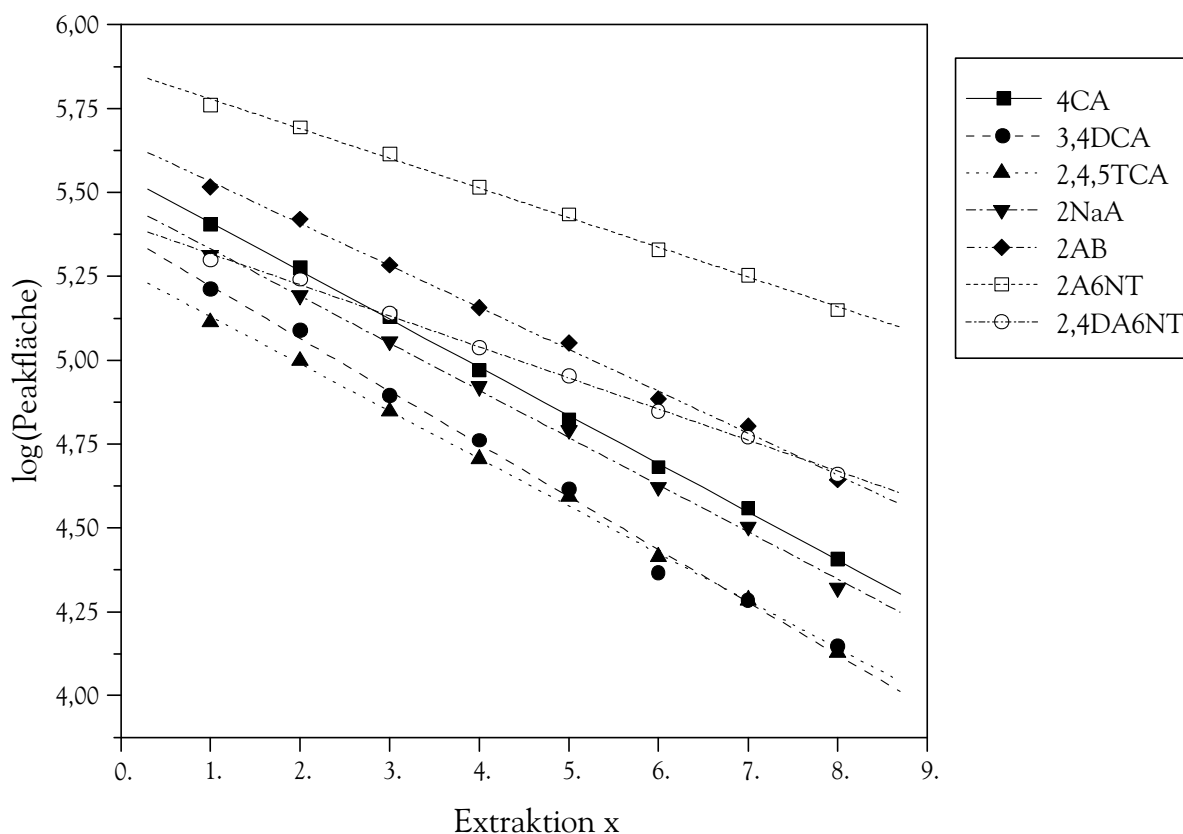


Abbildung 21: Mehrfache Extraktion einer Probe aromatischer Amine nach Derivatisierung, die die Ausgangsverbindungen in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/\text{L}$ enthielt. Die Probe wurde 9x für 30 min mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser extrahiert und die Stoffmengen mit GC-MS bestimmt. Aufgetragen sind die logarithmischen Peakflächen gegen die Extraktion x mit einer Ausgleichsgeraden gemäß Gleichung (14).

23,0 % sind die Derivate vergleichbar mit den am besten extrahierbaren Pestiziden. Dies verdeutlicht die Effizienz von Derivatisierung-SPME zur Bestimmung aromatischer Amine, bei der zwischen 17,3 % und 30,4 % der zur Verfügung stehenden Stoffmenge zur Analyse genutzt wurden.

Tabelle 16: Bestimmung der Extraktionsraten, extrahierten Stoffmengen und Verteilungskoeffizienten der Extraktion mit SPME aromatischer Amine nach Derivatisierung

Analyt	Extraktionsrate	Stoffmenge	Verteilungskoeffizient ^d	
	E /% ^{a,b,c}	n _f /ng ^{a,b}	K _{SPME} ^e	log K _{SPME}
Anilin	24,4 ± 1,6	2,7 ± 0,2	43745	4,64
4AT	28,6 ± 1,6	2,9 ± 0,2	74149	4,87
4CA	28,2 ± 0,6	2,6 ± 0,1	56772	4,75
3,4DCA	30,4 ± 2,1	2,6 ± 0,2	250809	5,40
2,4,5TCA	27,8 ± 1,0	2,2 ± 0,1	238420	5,38
3C4FA	28,1 ± 0,7	2,5 ± 0,1	52329	4,72
2,4DAT	27,8 ± 0,5	3,9 ± 0,1	166673	5,22
2,6DAT	27,6 ± 0,6	3,9 ± 0,1	78636	4,90
2NaA	27,7 ± 1,2	2,5 ± 0,1	315655	5,50
2AB	25,0 ± 1,2	2,1 ± 0,1	60511	4,78
4AB	23,1 ± 0,9	1,9 ± 0,1	204829	5,31
4NA	17,3 ± 3,0	1,6 ± 0,3	143065	5,16
2A4NT	18,4 ± 0,8	1,6 ± 0,1	37746	4,58
2A6NT	17,8 ± 1,1	1,5 ± 0,1	32385	4,51
4A2NT	17,9 ± 0,9	1,6 ± 0,1	45565	4,66
2A4,6DNT	11,5 ± 1,7	0,9 ± 0,1	13336	4,13
4A2,6DNT	13,4 ± 2,3	1,1 ± 0,2	15821	4,20
2,4DA6NT	19,2 ± 0,9	2,2 ± 0,1	109104	5,04

^a für eine 30minütige Extraktion mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser, Ausgangskonzentration c₀ = 0,5 µg/L, Probevolumen nach Derivatisierung V_s = 13 mL, x = 9 Extraktionen; ^b Vertrauensintervall für 95 % Wahrscheinlichkeit; ^c gemäß Gleichung (14); ^d extrapoliert auf das Gleichgewicht gemäß Gleichung (23); ^e gemäß Gleichung (22) für die Extraktionsraten im Gleichgewicht.

Im Gegensatz zu den Extraktionsraten, die direkt aus den Geradensteigungen ohne weitere Parameter berechnet werden können, bedarf es bei den absoluten Stoffmengen der Ausgangsstoffmenge n_{s,0}. Für deren Bestimmung ist die Ausbeute der Umsetzung erforder-

derlich, die aber bei den meisten Derivatisierungen nicht bekannt ist. Für die in Tab. 16 aufgeführten Stoffmengen wurde vereinfachend ein vollständiger Stoffumsatz angenommen. Hinzu kommt, dass sich die Molmasse infolge der Derivatisierung ändert. Die anfangs einheitlichen Stoffmengen von 5 ng je Analyt sind nach der Derivatisierung nicht mehr zum Vergleich der Verbindungen geeignet.

Hier sind die Extraktionsraten und Verteilungskoeffizienten vorteilhaft, da sie von den Stoffmengen unabhängig sind. Das gilt jedoch nicht für die klassische Bestimmung der Verteilungskoeffizienten durch Kalibrierung mit Standardlösungen. Gemäß Gleichung (1) bedarf es hier neben der absoluten extrahierten Stoffmenge n_f auch der Ausgangskonzentration c_s . Lässt man die bestimmten Extraktionsraten einfließen und formt Gleichung (1) mit $n_f = E \cdot n_s$ und $n_0 = c_s \cdot V_s$ um, so gelangt man zu folgendem Ausdruck:

$$K_{SPME} = \frac{V_s \cdot E}{V_f \cdot (1 - E)} \quad (22)$$

Dieser ist von Stoffmengen unabhängig, bedarf nur noch der Extraktionsrate und ist so auch für Verbindungen mit unbekannter Ausgangskonzentration wie die hier beschriebenen Derivate geeignet. Zudem sind die entsprechenden Standardverbindungen nicht erforderlich, die bei Flüssiginjektion zur Kalibrierung des Gerätes benötigt werden. Dies ist von Vorteil für Verbindungen, die wie die Derivate nicht kommerziell erhältlich sind.

Da sich die Verteilungskoeffizienten K_{SPME} auf das Gleichgewicht beziehen, waren zu ihrer Berechnung die Extraktionsraten im Gleichgewicht nötig. Da die Verbindungen mehrere Stunden bis zum Erreichen des Gleichgewichts brauchen, wurde die Äquilibrationszeit in Anlehnung an AI mit Gleichung (23) berechnet [158] (vgl. Kap. 7.4.2.3). Durch Vergleich der erwarteten Peakflächen für das Gleichgewicht mit denen bei 30minütiger Extraktion wurden die Extraktionsraten für das Gleichgewicht extrapoliert. Die so erhaltenen $\log K_{SPME}$ -Werte liegen zwischen 4,13 und 5,50 (vgl. Tab. 16). Damit überschreiten sie die entsprechenden $\log K_{OW}$ -Werte um durchschnittlich 0,93 Einheiten. Während die $\log K_{OW}$ -Werte der Derivate einen Bereich von 2,87 bis 5,28 abdecken (vgl. Tab. 9 auf Seite 62), ist er hier auf 1,34 Einheiten begrenzt. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von PASCHKE *et al.* für hydrophobe Verbindungen [138]. Anders

Tabelle 17: Verteilungskoeffizienten aromatischer Amine für die Extraktion mit 85 μm PA- bzw. 100 μm PDMS-Faser

Analyt	$\log K_{\text{PA}}$	$\log K_{\text{PDMS}}$	Lit.
Anilin	0,95	-	[120]
3,4DMA	1,49	-	[124]
2,4,6TMA	1,85	-	[124]
3,4DCA	3,31	1,71	[204]
3,5DCA	3,51	1,90	[204]
2,4,5TCA	3,55	-	[120]
4NA	2,16	0,38	[204]
2C4NA	2,73	0,45	[204]
4C2NA	2,96	0,90	[204]
2,6DC4NA	3,28	1,33	[204]

als für PDMS/DVB fanden sie für die Verteilungskoeffizienten von PDMS und PA eine wesentlich größere Bandbreite. Dies lässt vermuten, dass die Ergebnisse eng verknüpft sind mit der PDMS/DVB-Faser und der auf Adsorption basierenden Extraktion. Bei dieser Faser spielen die Zahl und die Verfügbarkeit der Sorptionsstellen offenbar eine größere Rolle als die Polarität der Analyten.

Die in der Literatur für aromatische Amine verfügbaren Verteilungskoeffizienten sind in Tab. 17 aufgeführt und beziehen sich ausschließlich auf die 85 μm PA- und 100 μm PDMS-Faser. Gegenüber den Aminen weisen die Derivate in Tab. 16 um mehr als 2 Größenordnungen höhere Verteilungskoeffizienten auf. Dies veranschaulicht die exzellente Extrahierbarkeit der Verbindungen und erklärt die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens (vgl. Kap. 7.4.3.6). Die Werte können jedoch nicht direkt verglichen werden, da die Derivate mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser angereichert wurden. Dennoch bestätigen diese experimentellen Befunde die berechneten $\log K_{\text{OW}}$ -Werte, die infolge der Derivatisierung zunehmen.

7.3 Screening

Die Arbeiten zum Screening gliedern sich in die Optimierung der Trennung (vgl. Kap. 7.3.1) und Detektion (vgl. Kap. 7.3.2) einer Reihe von Modellsubstanzen mit GC-AED. Darauf aufbauend wurde die Extraktion der Analyten nach Derivatisierung optimiert (vgl. Kapitel 7.3.3). Ihre Anwendung fanden die Arbeiten bei der Untersuchung von Rüstungsaltslasten (vgl. Kapitel 7.3.4) und Urinproben (vgl. Kapitel 7.3.5) auf aromatische Amine.

7.3.1 Trennung der Derivate

Die bei der Derivatisierung gebildeten iodhaltigen Verbindungen wurden auf ihre Eignung zur selektiven und sensitiven Detektion mit GC-AED untersucht. Die Trennung der aromatischen Iodide wurde untersucht mit einem Standard, der 26 aromatische Amine in einer Konzentration von 0,5 mg/L enthielt. Nach der Derivatisierung wurde die

Tabelle 18: Optimierte Bedingungen zur Trennung und Detektion aromatischer Amine nach Derivatisierung-SPME mit GC-AED

Gerät	GC-AED mit HP GC 6890 und AED G 2350
Trennsäule	Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Injektor	Split/splitless mit 0,8 mm SPME-Liner
Injektortemperatur	250°C isotherm
Split	nach 4 min Splitventil öffnen (Verhältnis 1:20)
GC-Programm	40°C für 2 min, mit 10°C/min auf 180°C heizen, mit 30°C/min auf 260°C heizen und 2,33 min halten (Gesamtdauer: 21 min)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
Detektion	Elementspuren I183, C179, C193 Reaktandgase: O ₂ : 15 psi, H ₂ : 10 psi, Makeup-Flow: 43 mL/min Helium Supply Pressure: 30 psi, Cavity Pressure: 2,0 psi Cavity-, Transferline-Temperatur: 250°C, 260°C

Lösung mit *n*-Hexan extrahiert. Vollständigen Stoffumsatz vorausgesetzt, enthielt der Hexan-Extrakt die Derivate in Konzentrationen von 3,9 bis 7,0 mg/L. Zur Trennung der Verbindungen wurde eine Stx-CLPesticides verwendet, deren Polarität mit einer Säule mit 5 % Diphenylsiloxan vergleichbar ist. Durch eine spezielle Siltek-Deaktivierung wird bei der Stx-CLPesticides der thermische Zerfall vermindert. Die Derivate wurden selektiv über die Iod-Spur I183 (182,966 nm) detektiert. Die Einstellungen zur Trennung und Detektion sind in Tab. 18 zusammengefasst. Abb. 22 zeigt ein Chromatogramm der Iod-Spur I183 unter optimierten Bedingungen, das nach Aufgabe von 1 μ L des Extrakts erhalten wurde. Die Retentionszeiten der Verbindungen mit den im Text verwendeten Abkürzungen sind in Tab. 19 nach ihren Ausgangsverbindungen geordnet. Über alle

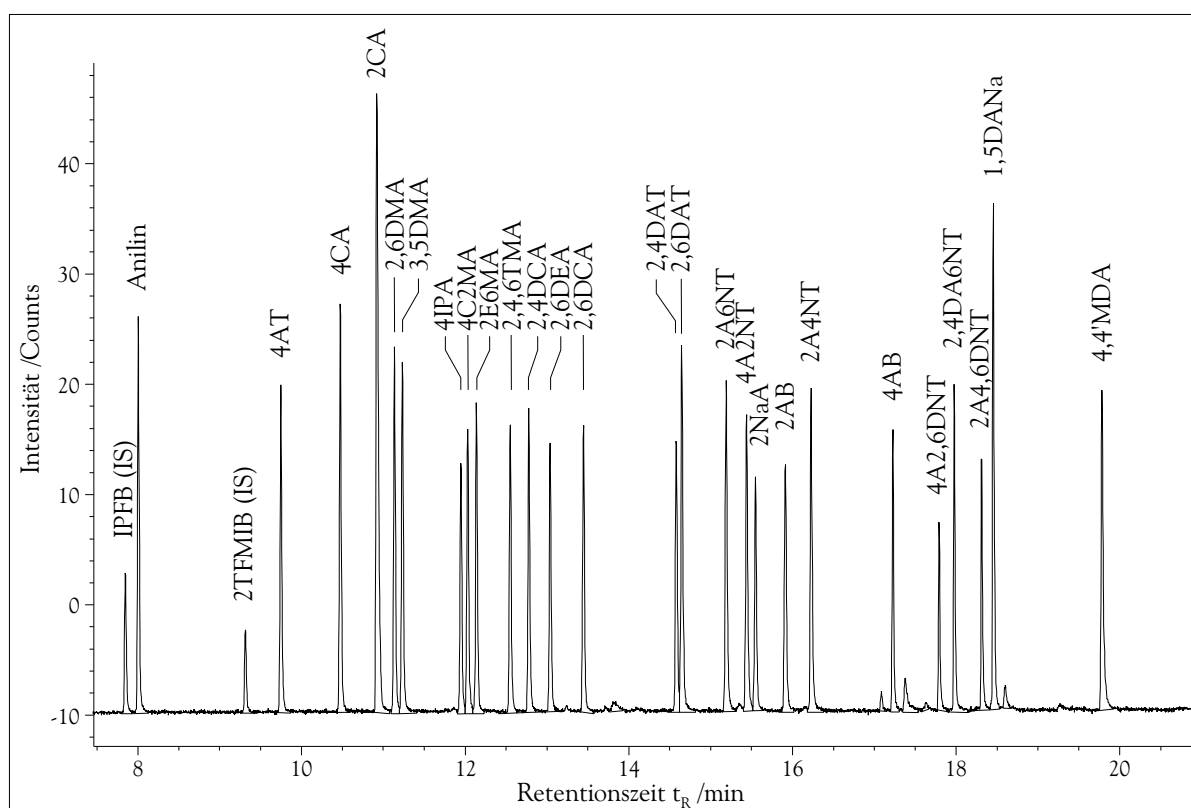


Abbildung 22: Chromatogramm eines Standards nach Derivatisierung und Extraktion mit *n*-Hexan. Die Trennung erfolgte mit einer Stx-CLPesticides Säule unter den in Tab. 18 abgedruckten Bedingungen. Von jedem Derivat wurden zwischen 3,9 und 7,0 ng aufgegeben. Gezeigt ist die Iod-Spur I183 für die Derivate der 28 in Tab. 19 aufgeführten Verbindungen

Tabelle 19: In Kap. 7.3 untersuchte Verbindungen mit Abkürzungen und Retentionszeiten bei Trennung mit GC-AED (vgl. Tab. 18).

Analyt	Abkürzung	t_R /min^a
Iodpentafluorbenzol (IS)	IPFB	7,81
2-Trifluormethyliodbenzol (IS)	2TFMIB	9,26
Anilin	Anilin	7,97
4-Aminotoluol	4AT	9,70
2,6-Dimethylanilin	2,6DMA	11,08
3,5-Dimethylanilin	3,5DMA	11,17
2,4,6-Trimethylanilin	2,4,6TMA	12,49
4-Isopropylanilin	4IPA	11,89
2-Ethyl-6-methylanilin	2E6MA	12,08
2,6-Diethylanilin	2,6DEA	12,97
2-Chloranilin	2CA	10,86
4-Chloranilin	4CA	10,42
4-Chlor-2-methylanilin	4C2MA	11,97
2,4-Dichloranilin	2,4DCA	12,71
2,6-Dichloranilin	2,6DCA	13,38
2-Amino-4-nitrotoluol	2A4NT	16,16
2-Amino-6-nitrotoluol	2A6NT	15,12
4-Amino-2-nitrotoluol	4A2NT	15,37
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	2A4,6DNT	18,27
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	4A2,6DNT	17,74
2,4-Diamino-6-nitrotoluol	2,4DA6NT	17,93
2-Naphthylamin	2NaA	15,48
2-Aminobiphenyl	2AB	15,84
4-Aminobiphenyl	4AB	17,18
2,4-Diaminotoluol	2,4DAT	14,51
2,6-Diaminotoluol	2,6DAT	14,58
1,5-Diaminonaphthalin	1,5DANa	18,41
4,4'-Methyldianilin	4,4'MDA	19,73

^a Messbedingungen vgl. Tab. 18.

Verbindungen hinweg zeigen die Analyten gute chromatographische Eigenschaften mit sehr guter Peaksymmetrie und kaum Tailing. Abgesehen der Derivate von 2,4DAT und 2,6DAT wurde für die Derivate Basislinientrennung erreicht. Es traten kaum Interferenzen durch Nebenprodukte der Derivatisierung oder aufgrund mangelnder Selektivität zu anderen Elementen auf.

7.3.2 Detektion mit AED

Der Atomemissionsdetektor atomisiert die von der GC-Säule eluierten Moleküle und regt die Atome in einem Helium-Plasma an. Dazu bedarf es neben dem Trägergas zusätzlichen Heliums als Makeup-Gas zur Unterhaltung des Plasmas. Um die Performance aufrecht zu erhalten werden zusätzlich Reaktandgase zugefügt. Die Energie für das Plasma von etwa 50 W wird durch Mikrowellen der Frequenz 2450 MHz erzeugt. So werden Temperaturen von etwa 2000°C erreicht. Die angeregten Atome emittieren Licht im UV/Vis-Bereich, das über ein holographisches Gitter dispergiert und mit einem Diodenarray im Bereich von 200 - 800 nm detektiert wird.

7.3.2.1 Makeup-Fluss

Der Makeup-Fluss ist für die Detektion von großer Bedeutung. Da das Plasma mit dem aus der GC-Säule austretenden Helium allein nicht aufrecht erhalten werden kann, muss vor der Detektion weiteres zugemischt werden. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurde das Makeup-Gas bei einem Helium Supply Pressure von 32 psi und einem Cavity Pressure von 1,5 psi eingestellt. Der Makeup-Fluss wurde im Bereich von 36 mL/min bis 80 mL/min variiert und am Purge-Ausgang mit einem Blasenähler gemessen. Für jede Einstellung wurden 3 Chromatogramme registriert. Es wurde ein mit deaktivierter Quarzwolle gefüllter Liner verwendet, um eine reproduzierbare Probenaufgabe mit guter Peakform zu gewährleisten. Mittels Autosampler HP 7673 wurden 2 µL des in Kapitel 7.3.1 genannten Standards injiziert. Abgesehen davon erfolgte die Trennung gemäß der in Tab. 18 auf Seite 87 beschriebenen Bedingungen.

Zum besseren Vergleich wurde für die Auswertung neben der Iod-Spur I183 die Kohlenstoff-Spur C193 herangezogen. Die mittleren Peakflächen der Mehrfachmes-

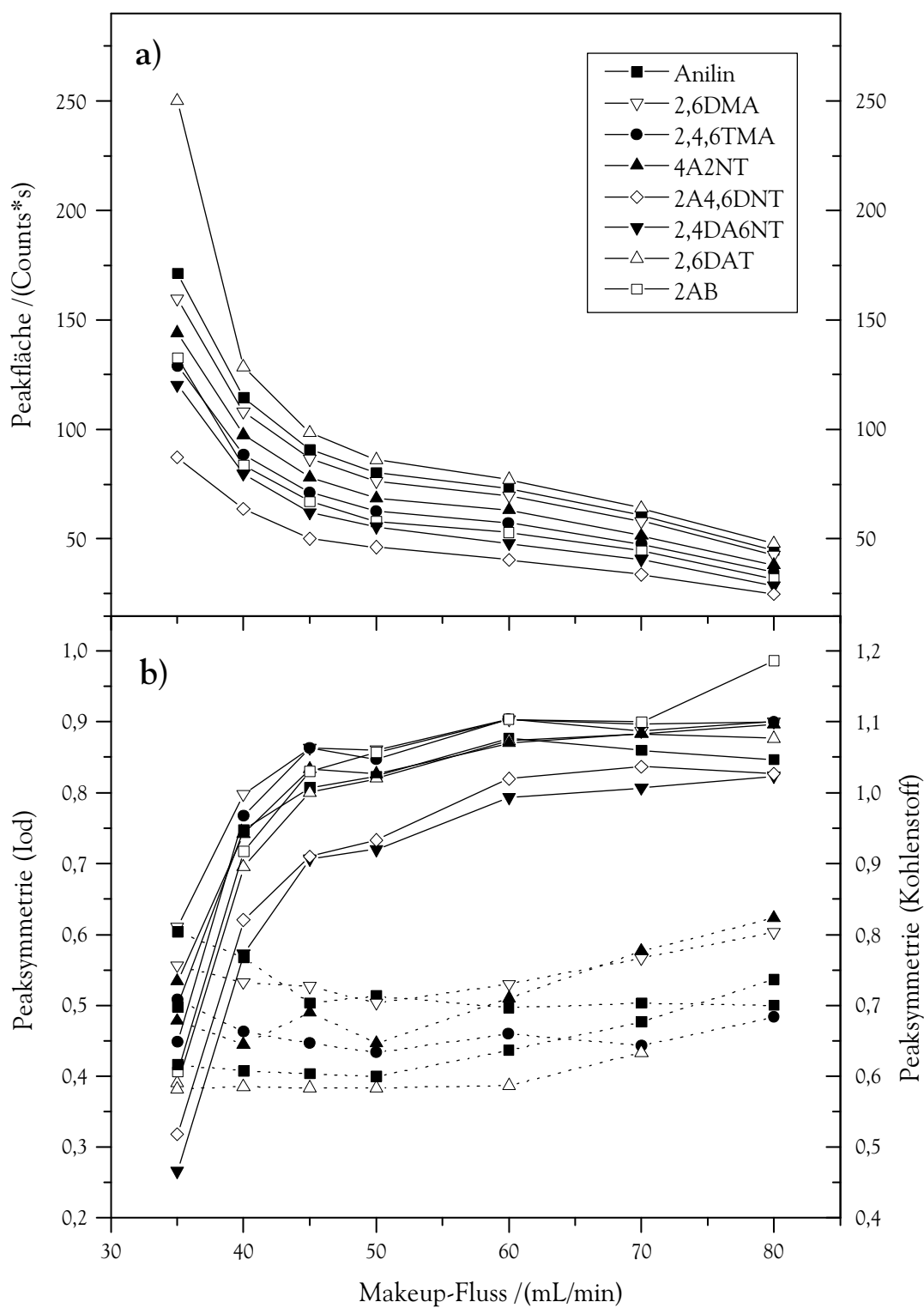


Abbildung 23: Einfluss des Makeup-Flusses auf 8 Derivate aromatischer Amine. Dargestellt sind a) die Peakflächen der Iod-Spur I183 und b) die Peaksymmetrien der Iod- (—■—) und der Kohlenstoff-Spur C193 (---■---) in Abhängigkeit vom Helium-Fluss. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung.

sungen wurden für die einzelnen Analyten gegen den Makeup-Fluss aufgetragen und die verschiedenen Elemente verglichen. Abb. 23 a) zeigt dies für die Iod-Spur I183 am Beispiel von 8 Analyten. Ungeachtet unterschiedlicher Peakflächen zeigen die verschiedenen Verbindungen einen sehr einheitlichen Verlauf, der gleichermaßen auch von der Kohlenstoff-Spur wiedergegeben wird (nicht gezeigt). Während für einen Makeup-Fluss von 36 mL/min für alle Analyten die besten Resultate erzielt wurden, gehen die Peakflächen mit zunehmendem Fluss auf durchschnittlich 26 % zurück. Ein derartiges Verhalten wurde auch von anderen Autoren für Halogene beobachtet [304–307]. Das zusätzliche Helium verringerte die Plasmatemperatur und veränderte so die Anregungsbedingungen für alle Elemente. Gleichzeitig wurden die von der GC-Säule eluierten Verbindungen mit dem Makeup-Gas zunehmend verdünnt, und die Verweilzeit im Plasma wurde verringert. Dies erklärt, warum sich der Effekt sowohl bei Iod und Kohlenstoff als auch über alle Analyten hinweg einheitlich bemerkbar machte.

Interessanterweise nahmen die Retentionszeiten mit dem Makeup-Fluss um 0,1 - 0,25 min zu. Dies lässt sich vermutlich mit dem zunehmenden Druck am Säulenende und dem dementsprechend veränderten Trägergasstrom erklären.

Die Bestimmung der Peaksymmetrie erfolgte mit der Chemstation-Software des GC-AED. Dazu wird im Peakmaximum das Lot gefällt und die Breiten links und rechts des Maximums auf $\frac{1}{10}$ der Peakhöhe zueinander in Relation gesetzt. Bei einem Wert von 1 gilt der Peak als symmetrisch und zeigt Fronting bei Werten < 1 und Tailing bei Werten > 1 .

Der Einfluss des Heliums auf die Peaksymmetrie der Kohlenstoff- und Iod-Signale ist dagegen unterschiedlich. Während die Kohlenstoff-Peaks keine Veränderung der Peakform erkennen lassen, nimmt die Symmetrie der Iod-Peaks mit dem Makeup-Fluss deutlich zu. Wie Abb. 23 b) erkennen lässt, beobachtet man für alle Verbindungen einen einheitlichen Trend. Mit mehr als 40 mL Helium/min lassen sich so für alle Verbindungen mit der Iod-Spur bessere Peaksymmetrien erreichen als mit der Kohlenstoff-Spur. Ein derart unterschiedliches Verhalten wird auf Wechselwirkungen einzelner Elemente mit der discharge tube zurückgeführt [305, 306]. Infolge der Adsorption an der Glasoberfläche beobachtet man für geringe Makeup-Flüsse ein deutliches Peaktailing. Dabei

spielen möglicherweise auch deutlich sichtbare Ablagerungen an der discharge tube von früheren Experimenten eine wichtige Rolle.

Für das weitere Arbeiten konnte mit einem Makeup-Fluss von 43 mL/min sowohl eine gute Empfindlichkeit wie eine ausreichende Trennung gewährleistet werden.

7.3.2.2 Reaktandgase

Dem Plasma werden Reaktandgase zugesetzt, um die Detektion zu verbessern. Ein kontinuierlicher Sauerstoffstrom soll die genannte Abscheidung von Kohlenstoff verhindern [308, 309] und so den Dauerbetrieb verbessern. Darüber hinaus wird dem Plasma Wasserstoff zugesetzt, um die Bildung stabiler Oxide zu unterdrücken und die Peakform zu verbessern [304, 310, 311]. QUIMBY *et al.* beobachteten weiterhin einen positiven Einfluss auf die Selektivität gegenüber anderen Elementen [310].

Da der Einfluss der Reaktandgase auf die Detektion von Iod wenig untersucht ist und stark von den weiteren Einstellungen abhängt, wurden für das bestehende System der Sauerstoff- und Wasserstoffdruck angepasst. Bei einem Makeup-Fluss von 43 mL/min wurden dazu 15, 20, 25 bzw. 30 psi Sauerstoff angelegt und für jede Einstellung der Wasserstoffdruck im Bereich von 10 bis 22 psi variiert. Unter Verwendung eines Autosamplers und eines mit Quarzwolle gefüllten Liners wurden 2 μ L des oben beschriebenen Standards (vgl. Kapitel 7.3.1 ab Seite 87) injiziert und ansonsten gemäß der Einstellungen in Tab. 18 auf Seite 87 getrennt und detektiert.

Die Auswertung erfolgte über die Iod-Spur I183 und die Kohlenstoff-Spur C193. Da für alle untersuchten Verbindungen ähnliche Trends beobachtet wurden, haben die Reaktandgase keinen nennenswerten Einfluss auf die Atomisierung. Die Peakflächen der Iod- wie der Kohlenstoff-Spur wurden jeweils auf den Maximalwert normiert und als Funktion des Wasserstoffdrucks aufgetragen wie Abb. 24 a) am Beispiel des Derivats von 2,6DAT zeigt. Für alle Verbindungen wurde die beste Empfindlichkeit für 15 psi Sauerstoff und 10 psi Wasserstoff erzielt. Der Sauerstoffdruck wurde darüber hinaus nicht weiter verringert, um irreversible Schäden an dem Quarzrohr durch Kohlenstoff-Ablagerungen zu vermeiden. Unabhängig von dem Sauerstoffdruck nehmen

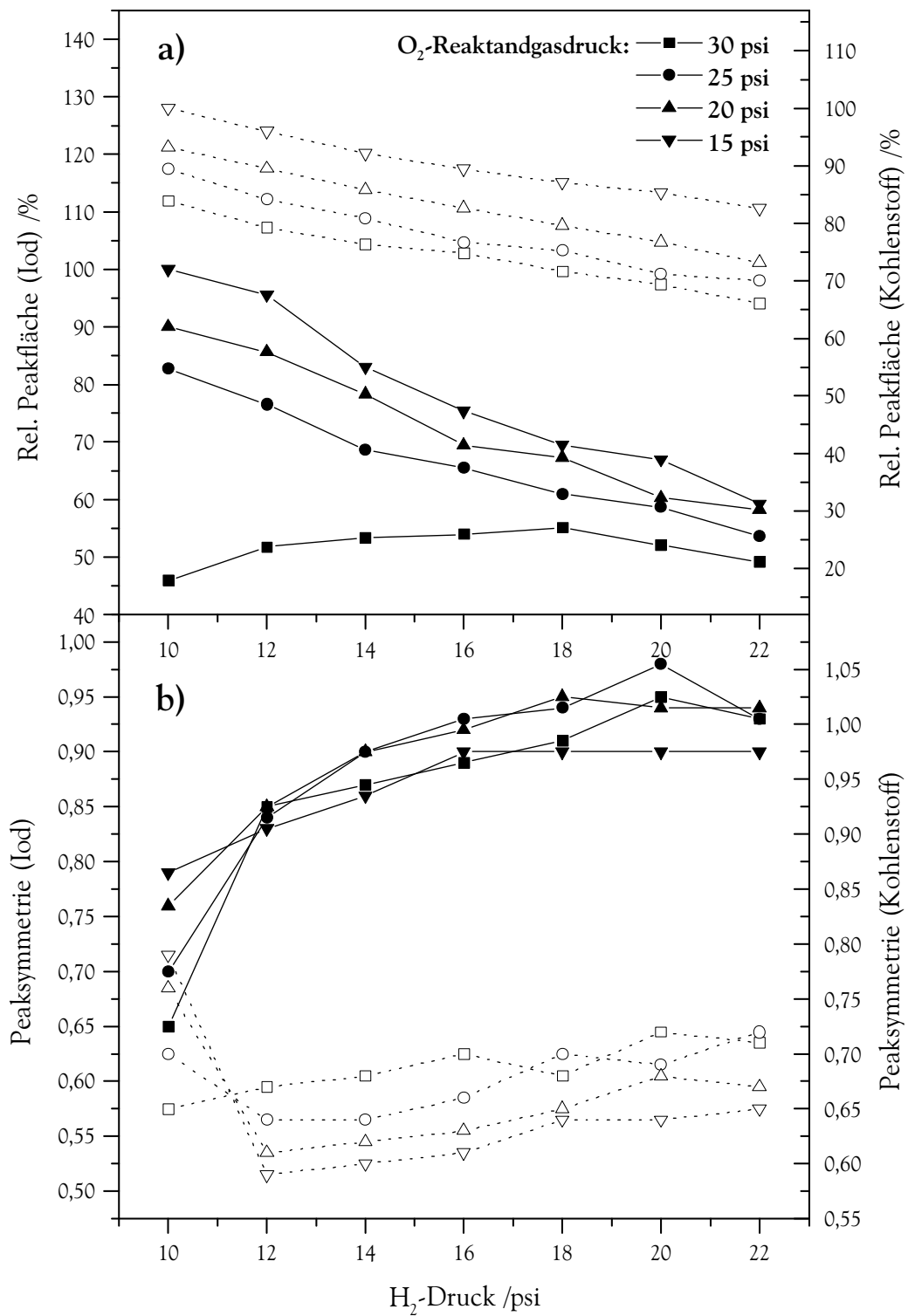


Abbildung 24: Dargestellt ist der Einfluss der Reaktandgase O₂ und H₂ auf a) die Peakfläche und b) die Peaksymmetrie am Beispiel von 2,6DAT. Bei konstantem O₂-Druck von 15 (—▼—), 20 (—▲—), 25 (—●—), 30 psi (—■—) wurde der H₂-Druck variiert. Durchgezogene Linien beziehen sich auf I183 (—■—), gepunktete auf C193 (---□---).

die Peakflächen für Iod und Kohlenstoff mit steigendem Wasserstoffdruck ab. Da dies beide Elemente gleichermaßen betrifft, lässt sich dies auf die durch Zumischen des Wasserstoffs veränderten Plasmaeigenschaften zurückführen. Ebenso ist die zu beobachtende Abnahme der Peakflächen mit Zunahme des Sauerstoffdrucks zu erklären. Während eine minimale Menge von weniger als 1 % Sauerstoff genügt, um Ablagerungen zu verhindern, machen sich größere Mengen negativ bemerkbar. Dies zeigt sich besonders bei 30 psi: Hier tritt bei Iod, anders als bei Kohlenstoff, für alle Verbindungen ein Maximum auf. Dies deutet darauf hin, dass der Sauerstoff mit einigen Elementen Oxide bilden kann, sofern nicht genügend Wasserstoff zugeleitet wird.

Wie Abb. 24 b) zeigt, wird eine gegenläufige Entwicklung für die Peakform beobachtet. Während für Kohlenstoff auch hier kein Trend zu erkennen ist, nimmt die Peaksymmetrie mit dem Wasserstoffdruck zu. Dies ist ein Effekt, der bereits früh bei Mikrowellenplasmen beobachtet [311], bislang aber noch nicht hinreichend erklärt wurde. Durch Zumischen von Wasserstoff lassen sich auf diese Weise für alle untersuchten Derivate sehr gute Peaksymmetrien erreichen. Diese sind deutlich besser als vergleichbare Werte der Kohlenstoff-Spur. Dagegen hat der Sauerstoffdruck weder auf Iod noch auf Kohlenstoff einen signifikanten Einfluss. Durch Zugabe von Wasserstoff kann so das Tailing infolge eines verminderten Makeup-Flusses kompensiert werden (vgl. Kap. 7.3.2.1). Eine Veränderung der Selektivität des Iod-Signals gegenüber Kohlenstoff konnte für keine der Messungen beobachtet werden. Auch hier beinhalten die Einstellungen einen Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und Trennleistung. Angesichts der akzeptablen Peakform wurden für die weiteren Messungen 15 psi Sauerstoff und 10 psi Wasserstoff zugeleitet.

7.3.3 Headspace-SPME

In diesem Kapitel wurde die Extraktion der Derivate aus dem Headspace untersucht, die anschließend mit GC-AED bestimmt wurden. Die Extraktion der Proben wurde ausschließlich manuell durchgeführt. Demgegenüber wurden die Proben in Kap. 7.4 mit einem Autosampler direkt extrahiert und die Derivate mit GC-MS bestimmt. Die Optimierung der Bedingungen für die Headspace-Extraktion erfolgte für die in Tab. 19 auf Seite 89 aufgeführten Analyten unter den in Tab. 18 genannten chromatographischen Bedingungen (vgl. Seite 87).

7.3.3.1 Aufbau und Durchführung

Für die manuelle Festphasenmikroextraktion aus dem Headspace wurde eine Apparatur entwickelt, die im wesentlichen aus einem Heizrührer und einem Wasserbad bestand. Dieses wurde über einen Rührer umgewälzt und die Temperatur über einen externen Regler mit Temperaturfühler eingestellt (vgl. Abb. 25). Über Stativklammern konnten Probe und SPME-Faserhalter exakt positioniert werden. Die Führungshilfe sorgte für

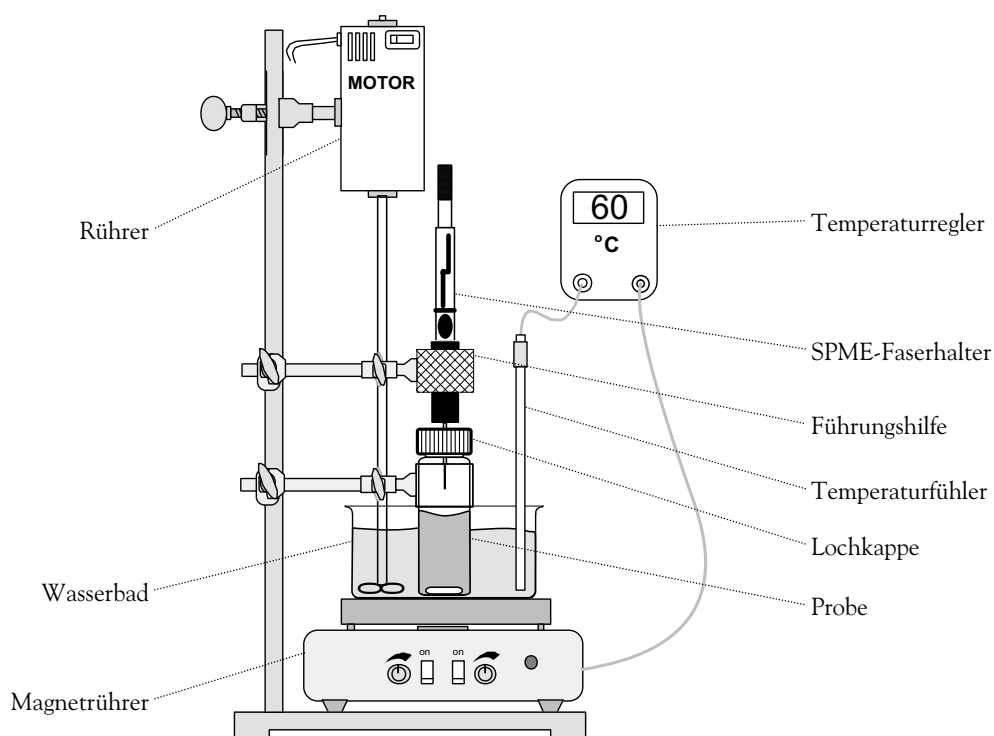


Abbildung 25: Apparatur für die manuelle Festphasenmikroextraktion

eine genaue Platzierung der SPME-Faser in der Probe und ließ sich für die direkte bzw. Extraktion aus dem Headspace frei einstellen. Es wurden 17 mL Probenfläschchen verwendet. Durch den einfachen, flexiblen Aufbau lässt sich dieser leicht modifizieren.

Durch Verwendung eines gerührten Wasserbades kann die Temperatur über einen weiten Temperaturbereich mit einer Abweichung von weniger als $\pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt werden. Eine Extraktionstemperatur von 60°C erwies sich hierbei als zweckmäßig (vgl. Kap. 7.3.3.3). Zudem ist gegenüber kommerziellen Geräten, bei denen die Probe in einen Metallblock gebracht wird, der Wärmetransfer durch den unmittelbaren Kontakt zum Wasser besser.

Für die Extraktion wurde nach der Derivatisierung die Schraubkappe des Vials durch eine Lochkappe mit Septum ersetzt und ein Rührfisch zugefügt. Dazu musste das Gefäß nur kurz geöffnet werden und Verluste durch Umfüllen in entsprechende Autosamplerflaschen wurden so minimiert. Um eine rasche Gleichgewichtseinstellung zu erzielen, wurde die Probe bei maximaler Rührgeschwindigkeit (1250 U/min) beständig und gleichmäßig durchmischt. Vor der Extraktion wurde die Probe 4 min auf die Temperatur des Wasserbades vorgewärmt. Die Extraktionszeit wurde mit 25 min an die Dauer des GC-Laufs angepasst (vgl. Kap. 18) und genügte bei vielen Analyten zum Erreichen des Gleichgewichts (vgl. Kap. 7.3.3.4). Nach der Extraktion wurde die Faser aus der Probe entfernt und im Injektor des GC für 5 min thermodesorbiert, während gleichzeitig die nächste Probe im Wasserbad vorbereitet wurde. Trotz des einfachen Aufbaus ließen sich so mit manueller Extraktion sehr gute Reproduzierbarkeiten erzielen (vgl. Kapitel 7.3.3.8). Die optimierten Extraktionsbedingungen sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Optimierte Bedingungen zur Extraktion der Derivate aus dem Headspace

Faserbeschichtung	65 μm PDMS/DVB
Probenvolumen	5 mL zzgl. Reagenzien
pH-Wert	≈ 5
Salzzugabe	keine
Extraktion	25 min bei 60°C und Rühren mit 1250 U/min
Desorption	5 min bei 250°C

7.3.3.2 Vergleich der SPME-Fasern

Aromatische Iodide, die Reaktionsprodukte der Derivatisierung, wurden bislang noch nicht mit Headspace-SPME untersucht. Da keinerlei Erfahrungen mit dieser Substanzklasse zu Grunde gelegt werden konnten, wurden die Extraktionsbedingungen sorgfältig optimiert. Entsprechend wurden 6 SPME-Fasern mit unterschiedlicher Beschichtung (65 μm PDMS/DVB, 70 μm CW/DVB, 50/30 μm DVB/Car/PDMS, 100 μm PDMS, 85 μm PA und 75 μm Car/PDMS) auf ihre Eignung zur Anreicherung der Verbindungen untersucht.

Dazu wurden in 17 mL Vials zunächst 24 Proben mit einem Volumen von jeweils 5 mL hergestellt, die die Analyten in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/L}$ enthielten, und, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert. Die Extraktion erfolgte manuell (vgl. Kap 7.3.3.1). Zu Beginn der Optimierung wurden die Proben auf 40°C thermostatisiert und mit 1250 U/min gerührt. Die SPME-Fasern wurden zuvor entsprechend der Empfehlungen des Herstellers konditioniert. Zu Beginn jeder Messreihe wurde eine Blindprobe auf Störpeaks untersucht. Mit Ausnahme von PDMS (n= 3) wurden mit jeder Faser im Anschluss 4 Proben für jeweils 25 min extrahiert. Bei allen Messungen erfolgte die Desorption der Analyten unter identischen Bedingungen bei 250°C im isothermen Injektor. Die Bestimmung der Derivate erfolgte mit GC-AED über die Iod-Spur I183 unter den in Tab. 24 auf Seite 121 aufgeführten Bedingungen.

In Abb. 26 sind Ausschnitte der Chromatogramme aller 6 Fasern dargestellt. Die Retentionszeiten der Analyten unterscheiden sich dabei von Faser zu Faser nur geringfügig. Eine Ausnahme bildet die Car/PDMS-Faser, bei der durchschnittlich um 0,01 min größere Retentionszeiten beobachtet wurden. Diese sind auf starke Wechselwirkungskräfte der Analyten mit dem Carboxen zurückzuführen, wie bereits früher bei GCB beobachtet wurden [312]. Infolge dessen erfolgt die Desorption nur langsam und führt zu dem starken Tailing, das in geringerem Maße auch bei DVB/Car/PDMS zu beobachten ist. Die Peakform bei Verwendung der PDMS- bzw. PA-Faser ist besser, lässt aber gleichfalls bei einigen Analyten wie 2,4DCA und 2,6DAT Tailing erkennen. Demgegenüber zeichnen sich PDMS/DVB und CW/DVB durch eine sehr gute Peakform aus. Zwar kann die Desorption durch eine höhere Injektortemperatur beschleunigt werden, dadurch verkürzt

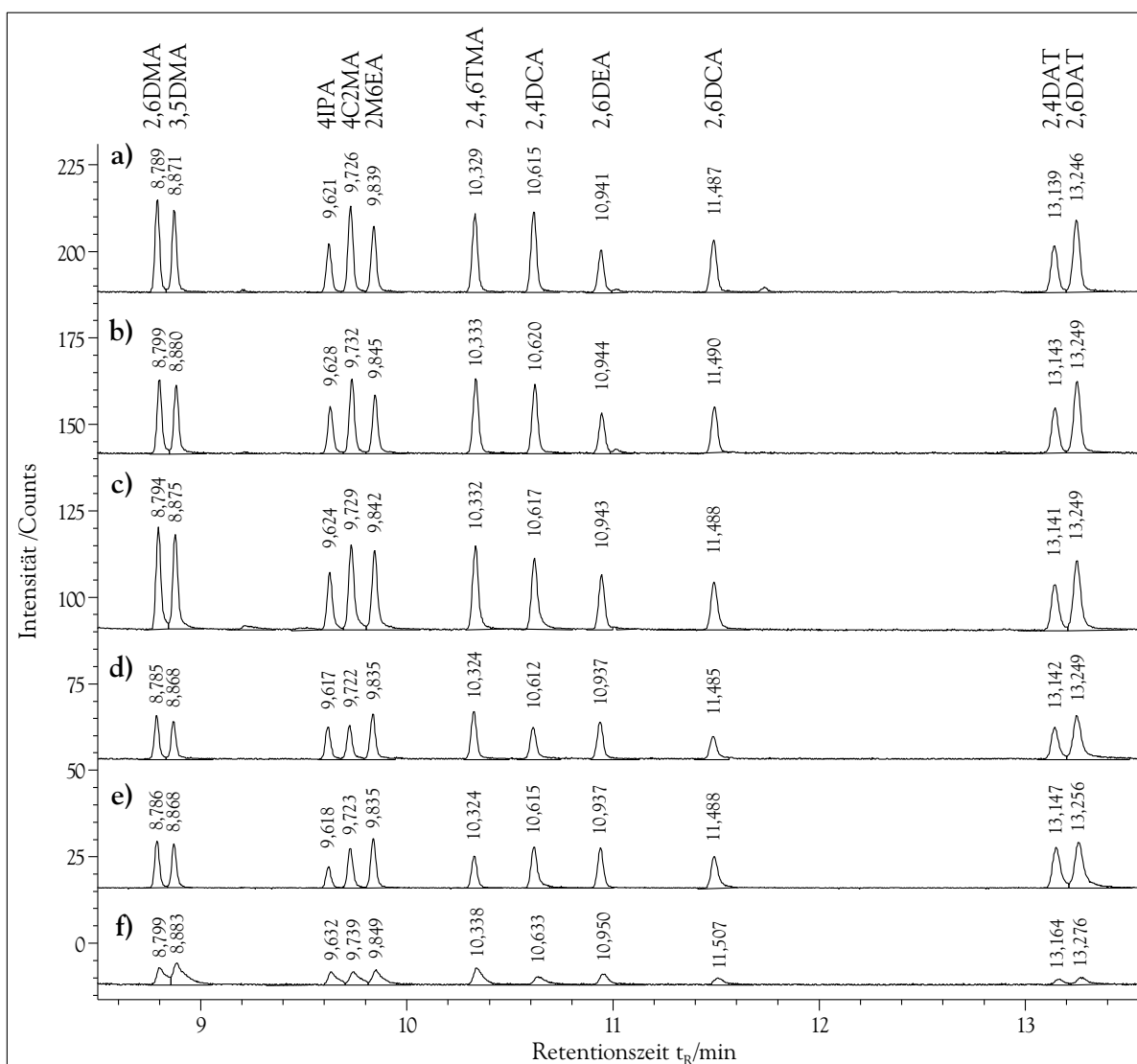


Abbildung 26: Ausschnitte aus den Chromatogrammen, die beim Faservergleich aufgezeichnet wurden. Die Proben mit einer Analytkonzentration von $2,5 \mu\text{g/L}$ wurden nach Derivatisierung bei 40°C 25 min mit a) einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser, b) einer $70 \mu\text{m}$ CW/DVB-Faser, c) einer $50/30 \mu\text{m}$ DVB/Car/PDMS-Faser, d) einer $100 \mu\text{m}$ PDMS-Faser, e) einer $85 \mu\text{m}$ PA-Faser und f) einer $75 \mu\text{m}$ Car/PDMS-Faser aus dem Headspace extrahiert. Alle Chromatogramme sind gleich skaliert und lediglich vertikal verschoben. Dargestellt ist die Iod-Spur I183 des GC-AED.

sich jedoch die Lebensdauer der SPME-Faser. So wurde bei CW/DVB und PA bereits im Laufe der 5 Extraktionen eine deutliche Braunfärbung der Beschichtung beobachtet, wohingegen beispielsweise PDMS/DVB und PDMS nahezu unverändert wirkten.

Beim Vergleich der Peakflächen werden die besten Ergebnisse von Fasern auf DVB-Basis erzielt (vgl. Abb. 27). Die Unterschiede treten beispielsweise bei den chlorierten Verbindungen deutlich hervor. Beim Vergleich der drei DVB-basierten Fasern untereinander schneidet DVB/Car/PDMS am besten ab. Dies gilt insbesondere für die alkylierten und chlorierten Verbindungen. Demgegenüber ist die CW/DVB-Faser bei den später eluierten bicyclischen Verbindungen ebenso wie bei den nitrierten Derivaten leicht im Vorteil. Die PDMS/DVB-Faser zeigt geringfügig schlechtere Resultate, erweist sich aber ebenfalls für alle Verbindungen als geeignet. Diesen Fasern gemein ist das DVB-Material, das ihnen adsorptive Eigenschaften verleiht.

Deutlich geringer sind die Peakflächen bei den reinen Verteilungsfasern PA und PDMS. PA und PDMS liefern insgesamt einander vergleichbare Ergebnisse, obgleich die PA-Faser als deutlich polarer beschrieben ist (vgl. Kap. 4.3.1). Während PDMS für alkylierte Verbindungen geringfügig im Vorteil ist, werden mit PA bei den Derivaten chlorierter und nitrierter aromatischer Amine bessere Resultate erzielt. Beim Vergleich der Verteilungsfasern mit den DVB-basierten Fasern wird deutlich, dass die Polarität der Faser allein nicht ausschlaggebend ist. Ebenso wichtig ist der auf Verteilung bzw. Adsorption beruhende Extraktionsmechanismus.

Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit der Car/PDMS-Faser erzielt. Lediglich das Derivat von Anilin ließ sich damit hinreichend extrahieren. Dieses Ergebnis sollte jedoch angesichts hoher Standardabweichungen nicht überbewertet werden. Obwohl die Extraktion bei dieser Faser ebenfalls auf Adsorption beruht, kann sie die Ergebnisse der DVB-Fasern nicht erreichen. Dies lässt sich auf das mikroporöse Carboxen-Material zurückführen, das verglichen mit DVB deutlich geringere Porengrößen aufweist und vom Hersteller nur für niedermolekulare Verbindungen bis 275 g/mol empfohlen wird.

Die untersuchten nitrosubstituierten Verbindungen sowie 4,4'MDA wurden unter den gewählten Bedingungen nur von einzelnen Fasern in geringem Maße extrahiert. Aus diesem Grunde wurden sie nicht weiter in die Bewertung einbezogen.

Zur Beurteilung der einzelnen Fasern müssen darüber hinaus die auftretenden Störpeaks berücksichtigt werden. Diese machten sich besonders bei CW/DVB, PA und DVB/Car/PDMS sowie bei Detektion über die Kohlenstoff-Spur C179 bemerkbar. Da es

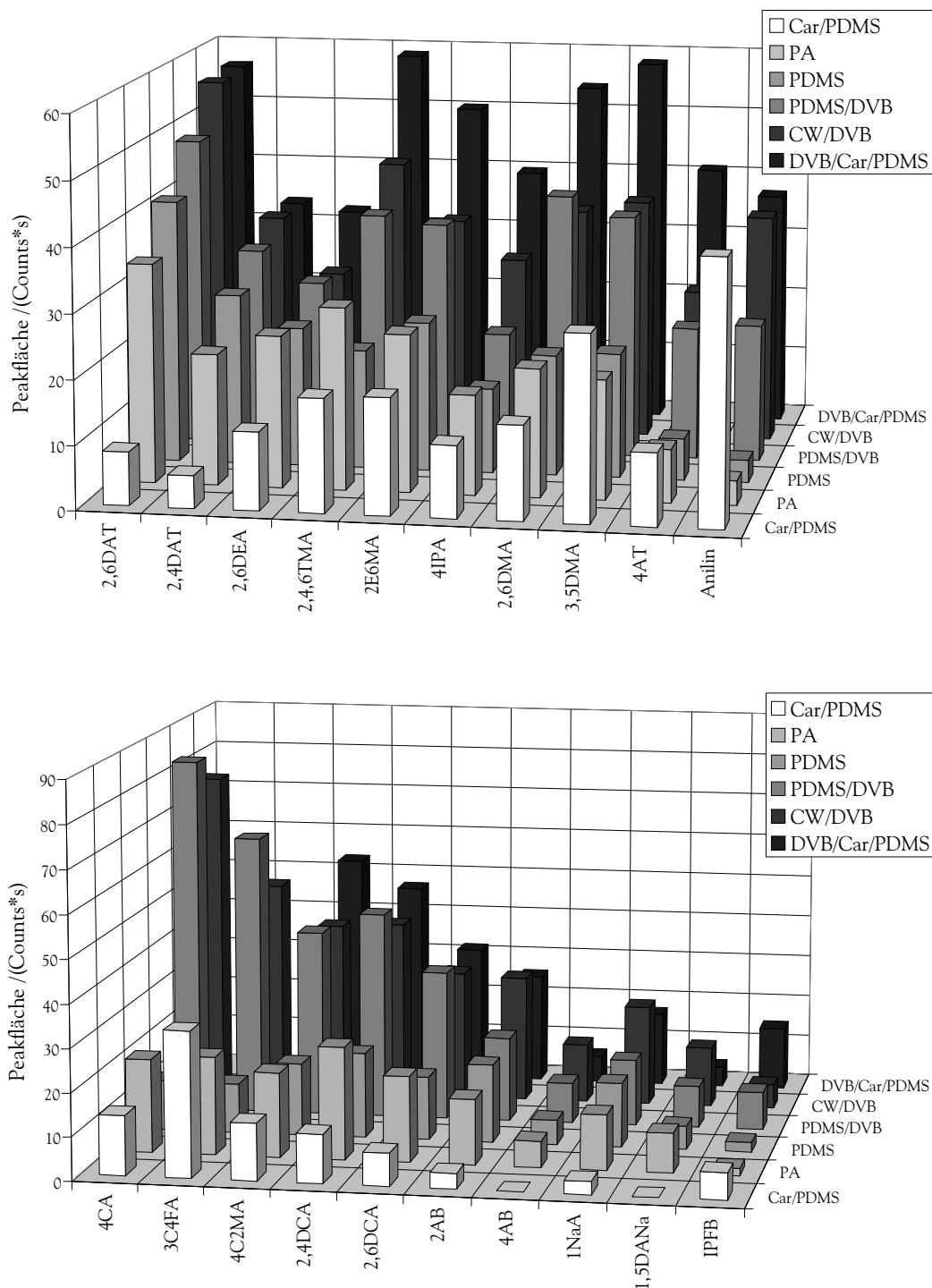


Abbildung 27: Vergleich verschiedener Fasern bei Headspace-SPME anhand der Peakflächen der Analyten. Ausgehend von einer Analytkonzentration von $2,5 \mu\text{g}/\text{L}$ wurden die Verbindungen nach Derivatisierung unter Rühren bei 40°C aus dem Headspace extrahiert. Abgesehen von PDMS ($n=3$) handelt es sich bei den Werten jeweils um die Mittelwerte von $n=4$ Messungen.

sich bei CW/DVB und PA um die Fasern handelt, die bereits durch eine rasche Alterung auffielen, sind die entsprechenden Signale vermutlich auf thermische Zerfallsprodukte des polymeren Materials zurückzuführen.

Für alle weiteren Experimente wurde die PDMS/DVB-Faser ausgewählt, obwohl die extrahierten Stoffmengen bei DVB/Car/PDMS und CW/DVB besser sind. Demgegenüber zeichnet sich die PDMS/DVB-Faser durch bessere chromatographische Eigenschaften und eine hohe Haltbarkeit aus. So konnte die PDMS/DVB-Faser bei Headspace-SPME und sorgfältiger Handhabung bis zu 100mal wiederverwendet werden.

7.3.3.3 Einfluss der Extraktionstemperatur

Die Verteilungskoeffizienten bei der Extraktion aus dem Headspace können über die Extraktionstemperatur beeinflusst werden. Dies ist besonders für Verbindungen interessant, die aufgrund niedriger HENRY-Konstanten nur in geringem Maße angereichert werden. Die Notwendigkeit zur Erhöhung der Extraktionstemperatur zeigte sich bereits in Kap. 7.3.3.2, da Verbindungen wie 4,4'MDA bei 40°C nicht nachweisbar waren.

Für die Variation der Extraktionstemperatur wurden insgesamt 24 Proben hergestellt. Diese enthielten die Analyten in einer Konzentration von 2,5 µg/L. In 17 mL Vials wurden dazu 5 mL Wasser mit den Analyten versehen und anschließend, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert. Vor der Extraktion wurden die Vials im Wasserbad 4 min thermostatisiert. Anschließend wurden die Proben 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert. Beginnend mit einer Temperatur von 30°C wurde die Extraktionstemperatur in 10°C-Schritten auf 80°C erhöht. Für jede der Temperaturen wurden 4 Proben untersucht. Die Bestimmung erfolgte mit GC-AED über die Iod-Spur I183 unter den in Tab. 24 auf Seite 121 zusammengefassten Bedingungen. Aufgrund technischer Probleme konnten von den Messungen bei 30°C und 40°C nur 2 bzw. 3 verwendet werden.

Die Auswertung erfolgte über die Mittelwerte der Peakflächen, die in Abb. 28 für einige ausgewählte Analyten dargestellt sind. In Tab. 21 sind die relativen Peakflächen bezogen auf den jeweiligen Maximalwert des Analyten dargestellt. Die Temperatur hat auf die

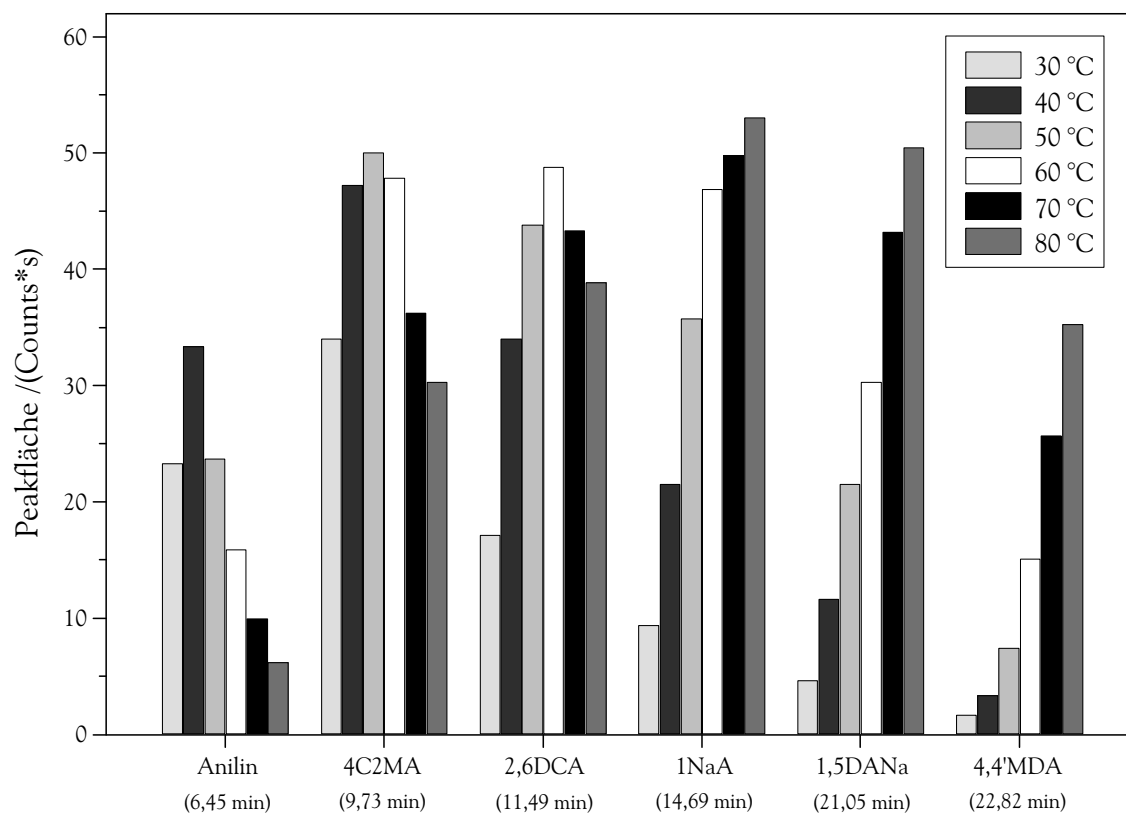


Abbildung 28: Einfluss der Temperatur auf die Extrahierbarkeit der Derivate aus dem Headspace. Dargestellt sind die mittleren Peakflächen in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Verbindungen sind nach zunehmender Retentionszeit geordnet. Die Proben wurden für 25 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert und mit GC-AED bestimmt.

Extraktion einer jeden Verbindung einen großen Einfluss. Die Peakflächen nehmen mit der Extraktionstemperatur zu, durchlaufen ein Maximum und gehen anschließend zurück. Dieser Kurvenverlauf ist für alle Analyten gleich, auch wenn bei einigen Verbindungen das Maximum bei 80°C noch nicht erreicht ist. Durch die Erhöhung der Temperatur nimmt die HENRY-Konstante und mit dem Verteilungskoeffizienten zwischen Probe und Headspace K_{hs} auch die extrahierte Stoffmenge zu. Zudem wird das Gleichgewicht durch raschere Diffusion schneller erreicht. Gleichzeitig ist der Verteilungskoeffizient zwischen Faserbeschichtung und Headspace K_{fh} temperaturabhängig. Dieser nimmt mit zunehmender Temperatur ab und erklärt so die Abnahme der Peakflächen.

Tabelle 21: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Peakfläche der Derivate. Für jede der Temperaturen wurden 2 - 4 Proben mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser 25 min aus dem Head-space extrahiert. Die Mittelwerte sind bezogen auf den Maximalwert jedes Analyten dargestellt. In der Tabelle sind die Derivate nach zunehmender Retentionszeit geordnet.

Analyt	t_{R}^d /min	Relative Peakfläche /%					
		30°C ^a	40°C ^b	50°C ^c	60°C ^c	70°C ^c	80°C ^c
Anilin	6,45	69,9	100	71,0	47,8	30,0	18,7
4AT	7,60	77,6	100	97,7	84,5	55,1	40,2
2,6DMA	8,79	79,2	100	95,7	84,5	61,5	45,7
3,5DMA	8,88	81,4	99,8	100	94,6	71,6	53,8
4IPA	9,62	72,6	95,0	100	99,8	69,3	56,5
4C2MA	9,73	68,0	94,4	100	95,6	72,5	60,6
2M6EA	9,84	77,6	99,9	100	88,2	71,8	58,6
2,4,6TMA	10,33	70,3	96,1	98,2	100	72,1	63,3
2,4DCA	10,62	52,7	83,6	94,7	100	84,2	73,0
2,6DEA	10,94	85,6	99,3	97,0	100	79,1	65,9
2,6DCA	11,49	35,2	69,8	89,9	100	88,8	79,7
2,4DAT	13,15	37,5	71,7	88,5	100	96,4	89,8
2,6DAT	13,26	36,2	73,0	90,4	100	95,6	84,6
2A6NT	14,10	15,6	23,9	40,3	55,7	84,5	100
4A2NT	14,52	0,0	11,5	21,3	55,6	66,7	100
1NaA	14,69	17,8	40,6	67,5	88,4	94,0	100
2AB	15,35	17,5	40,0	62,0	87,9	93,3	100
2A4NT	15,85	0,0	15,9	23,4	47,9	62,0	100
4AB	18,24	10,1	25,9	47,3	72,1	83,0	100
2,4DA6NT	20,20	0,0	14,6	26,7	31,6	63,9	100
1,5DANa	21,05	9,3	23,1	42,7	60,2	85,6	100
4,4'MDA	22,82	4,8	9,7	21,2	42,8	72,9	100

^a n= 2, ^b n= 3, ^c n= 4 Proben; ^d GC-Parameter vgl. Tab. 24 auf Seite 121; Ausgangskonzentration 2,5 $\mu\text{g/L}$, 7 mL Probevolumen im 17 mL Vial nach Derivatisierung.

Die Analyten unterscheiden sich in der Lage des Maximums. Während sich bei den Derivaten von Anilin und 4AT 40°C als ausreichend erwies, erforderten 4C2MA und 2,6DCA 50°C bzw. 60°C für eine optimale Extraktion. Demgegenüber ließen sich Analyten wie 1,5DANa und 4,4'MDA am besten bei der Maximaltemperatur von 80°C extrahieren (vgl. Abb. 28). Diese Unterschiede können auf die verschiedenen HENRY-Konstanten der Derivate zurückgeführt werden. Als Kompromiss wurde für alle weiteren Experimente eine Extraktionstemperatur von 60°C gewählt.

Die optimalen Extraktionstemperaturen nehmen mit der Retentionszeit der Derivate zu, da in beiden Fällen Gleichgewichte zwischen flüssiger und gasförmiger Phase auftreten, die sich mit steigender Temperatur zugunsten der Gasphase verschieben. So nimmt die Konzentration der Analyten in der Gasphase mit der Temperatur zu und begünstigt damit sowohl die Extraktion wie die Elution von der GC-Säule. Obwohl es sich im einen Fall um ein Zweiphasen- im anderen um ein Dreiphasen-System mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen handelt, wurde eine gute Übereinstimmung beobachtet. Auf einen Zusammenhang zwischen Retentionszeit und Verteilungskoeffizienten bei SPME wiesen bereits SCHÄFER *et al.* hin [313, 314]: Bei einem Zweiphasen-System Faser/Gas konnten sie zeigen, dass auch die logarithmischen Verteilungskoeffizienten $\log K_{fg}$ proportional zu den von KOVÁCS entwickelten Retentionsindices [315] zunehmen.

7.3.3.4 Variation der Extraktionszeit

Da sich bei SPME ein Gleichgewicht zwischen Beschichtung und Probe ausbildet, spielt die Extraktionszeit eine besondere Rolle. Unter Gleichgewichtsbedingungen wird die maximale Empfindlichkeit erreicht und Schwankungen der Extraktionszeit können vernachlässigt werden.

Zur Erfassung der Äquilibrierungskurven wurde deshalb die Extraktionszeit zwischen 5 und 120 min variiert. Dazu wurden in 17 mL Vials Proben mit einem Volumen von 5 mL hergestellt, die die Analyten in einer Konzentration von 2,5 µg/L enthielten. Die Analyten wurden derivatisiert und anschließend bei 60°C mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert. Die Messung erfolgte mit GC-AED über die selektive

Detektion der Iod-Spur I183.

Abgesehen von 5 min Extraktionszeit ($n=4$) wurden für jede Extraktionszeit jeweils $n=3$ Proben untersucht. Geordnet nach zunehmender Extraktionszeit wurden jeweils die Proben gleicher Extraktionszeit zusammen untersucht. Extraktion und Messung wurden so aufeinander abgestimmt, dass der GC-Lauf unmittelbar nach Ende der Extraktion erfolgen konnte. Von den Mehrfachmessungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und gegen die Extraktionszeit aufgetragen. Die so erhaltenen Äquilibriumskurven sind in Abb. 29 aufgetragen. Bei allen Proben ist eine Zunahme der Peakfläche mit der Extraktionszeit und eine Annäherung an den Gleichgewichtszustand zu beobachten. Beim Vergleich von Abb. 29a) - c) fallen darüber hinaus deutliche Unterschiede zwischen den Äquilibriumzeiten der Analyten auf.

Zur Bestimmung der Äquilibriumzeit wurde eine Ausgleichsrechnung unter Verwendung von (23) vorgenommen.

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{x}{t}} \quad (23)$$

Die Fit-Funktion wurde verglichen mit AI [158] um eine Konstante erweitert, so dass die Kurve den Ursprung nicht zwingend schneidet, um so den experimentellen Gegebenheiten besser gerecht zu werden. Auf diese Weise konnten auch die Äquilibriumzeiten von Analyten bestimmt werden, für die das Gleichgewicht nicht innerhalb der untersuchten 120 min erreicht wurde. Die entsprechenden Äquilibriumzeiten sind in Tab. 22 zusammen mit den Korrelationskoeffizienten zusammengefasst.

Die Korrelationskoeffizienten R^2 bewegen sich im Bereich zwischen 0,732 und 0,998. Mit den Äquilibriumzeiten nehmen die Korrelationskoeffizienten zu, weil in dem Fall die Kurve bis zum Erreichen des Gleichgewichts durch mehr Punkte beschrieben wird. Darüber hinaus sind häufig bei Analyten mit kurzen Äquilibriumzeiten Schwankungen (Anilin) oder eine Abnahme der Peakflächen nach Überschreitung des Gleichgewichtszustandes zu beobachten (4CA und 3C4FA). Aus diesem Grunde wurden für die letzt genannten Analyten nur die Messungen zwischen 5 und 45 min Extraktionszeit berücksichtigt. Die SPME-Faser hat zu Beginn der Extraktion Raumtemperatur

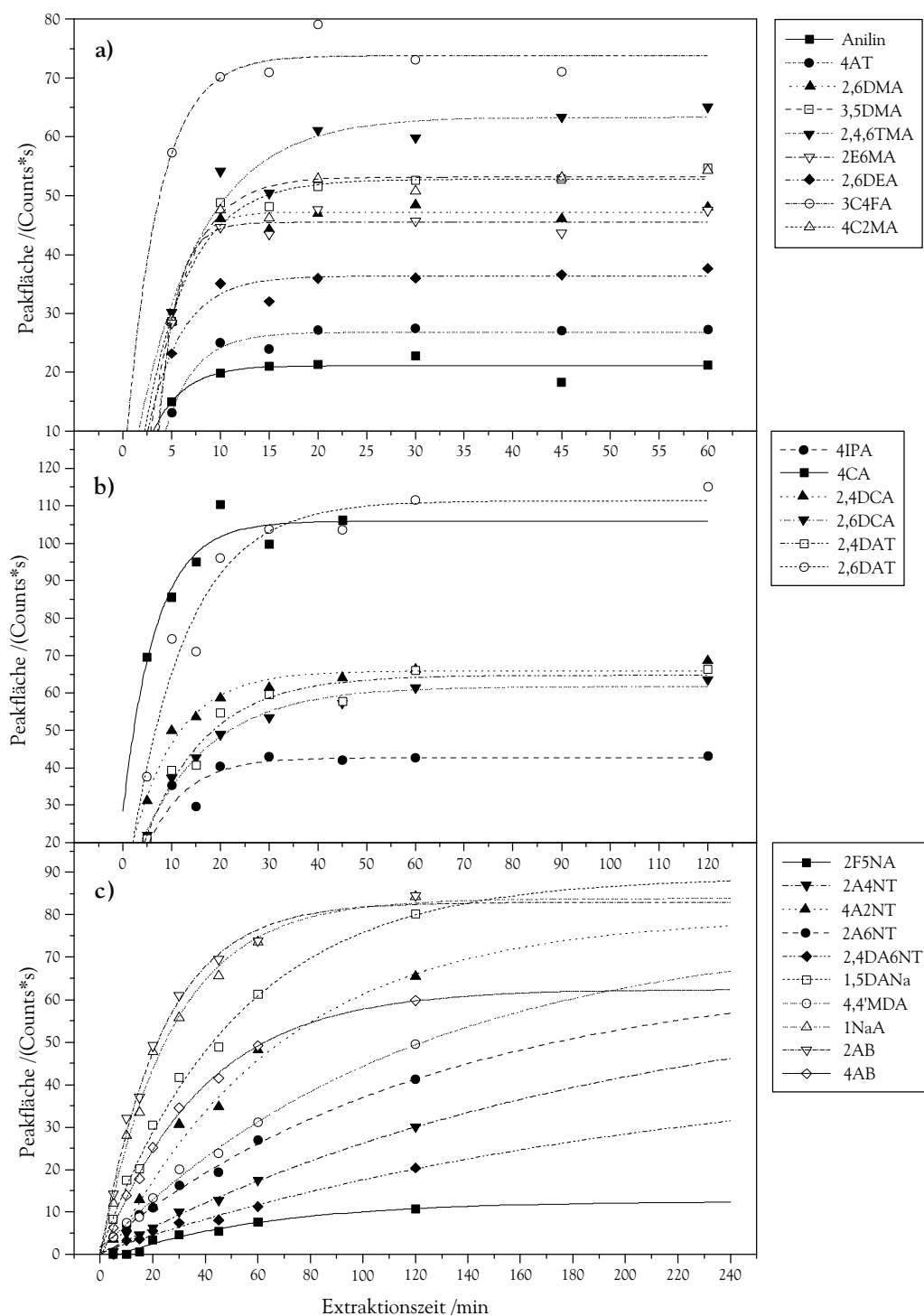


Abbildung 29: Äquilibrierungskurven aromatischer Amine nach Derivatisierung bei Extraktion aus dem Headspace. Aufgetragen sind jeweils die mittleren Peakflächen als Funktion der Extraktionszeit. Die Proben wurden bei 60°C mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Ausgleichskurven wurden gemäß Gleichung (23) berechnet.

Tabelle 22: Äquilibrierungszeiten aromatischer Amine nach Derivatisierung bei Extraktion aus dem Headspace. Extrahiert wurde mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser bei 60°C. Die Korrelationskoeffizienten R^2 beziehen sich auf die Ausgleichsrechnung nach (23). Die Äquilibrierungszeiten wurden für $y = 0,95y_0$ bestimmt.

Analyt	t_R /min ^b	R^2	Äquilibrierungszeit /min
Anilin	6,45	0,732	11
4AT	7,60	0,954	12
4CA	8,20	0,897	18
3C4FA	8,28	0,835	10
2,6DMA	8,79	0,954	9
3,5DMA	8,88	0,953	13
4IPA	9,62	0,873	24
4C2MA	9,73	0,937	15
2M6EA	9,84	0,937	9
2,4,6TMA	10,33	0,911	20
2,4DCA	10,62	0,971	26
2,6DEA	10,94	0,879	12
2,6DCA	11,49	0,985	41
2F5NA	12,91	0,974	181
2,4DAT	13,15	0,955	38
2,6DAT	13,26	0,946	35
2A6NT	14,10	0,995	383
4A2NT	14,52	0,978	200
1NaA	14,69	0,991	81
2AB	15,35	0,991	71
2A4NT	15,85	0,993	585
4AB	18,24	0,998	116
2,4DA6NT	20,20	0,979	644
1,5DANa	21,05	0,994	156
4,4'MDA	22,82	0,995	351

^a nur mit 6 Werten (5 - 45 min Extraktionszeit); ^b GC-Parameter vgl. Tab. 24 auf Seite 121.

und nimmt nur allmählich die Temperatur der Probe an. Da diese Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Headspace und Beschichtung hat (vgl. Kap. 7.3.3.3), nimmt mit der Erwärmung die extrahierte Stoffmenge ab [159].

Bereits bei einer Extraktionszeit von 25 min wird das Gleichgewicht für viele Analyten erreicht. Dazu zählen alle alkylierten bzw. monochlorierten Amine. Für die Dichloraniline sowie die Diaminotoluole wird das Gleichgewicht annähernd erreicht. Dagegen sind für die bicyclischen Systeme und besonders für nitrosubstituierte Analyten deutlich längere Äquilibrationszeiten erforderlich. Insofern erscheint eine Extraktionszeit von 25 min als angemessener Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und Probendurchsatz, zudem eine Anpassung der Extraktionszeit an letztgenannte Analyten nicht praktikabel erscheint. Mit 25 min ist die Extraktionszeit optimal an die Dauer eines GC-Laufs incl. Abkühlzeit angepasst.

Die Relativen Standardabweichungen der Mehrfachmessungen gehen mit zunehmender Extraktionszeit zurück. Dies gilt auch für Analyten, die den Gleichgewichtszustand bereits erreicht haben. Besonders hohe Relative Standardabweichungen sind für kurze Extraktionszeiten zwischen 5 und 15 min zu beobachten (im Mittel 26,9 %, 22,6 % bzw. 21,2 %), während darüber hinaus deutlich bessere Reproduzierbarkeiten erreicht werden (im Durchschnitt 14,4 %, 11,8 %, 8,7 %, 10,6 % bzw. 5,5 % für 20 bis 120 min Extraktionszeit). Zum einen lässt sich die Extraktionszeit bei manueller SPME nicht exakt einhalten, was sich besonders bei kurzen Extraktionszeiten bemerkbar macht. Zudem gleichen sich Temperaturschwankungen über längere Zeiträume besser aus. Daran wird deutlich, wie wichtig eine gute Thermostatisierung der Probe mit reproduzierbarer Durchmischung ist.

7.3.3.5 Bedeutung der Salzzugabe

Die Zugabe von Salzen wie Natriumchlorid, Natriumsulfat, Ammoniumsulfat oder Kaliumcarbonat kann dazu verwendet werden, die Verteilungskoeffizienten K_{fs} und damit die extrahierte Stoffmenge zu vergrößern. Da die präzise Einwaage des Salzes für jede einzelne Probe aufwendig ist, wurde stattdessen eine konzentrierte Lösung im Anschluss an die Derivatisierung zugegeben, um die Reaktion nicht zu beeinflussen. Mit Lithiumchlorid wurde ein Salz mit einer hohen Löslichkeit gewählt, das gleichzeitig keinen Einfluss auf den pH-Wert der Lösung hat.

Dazu wurden in 17 mL Vials 15 Proben mit einem Volumen von 5 mL hergestellt, die die Analyten in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/L}$ enthielten. Die Proben wurden wie in Kap. 7.1.1 beschrieben derivatisiert und jeweils drei mit 0 mL, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL bzw. 3 mL einer Lithiumchlorid-Lösung (10 mol/L) versehen. Durch Zugabe von Wasser wurden die Proben auf ein einheitliches Volumen von 10 mL aufgefüllt. Dadurch verfügten alle über das gleiche Headspace-Volumen und konnten auch bei intensivem Rühren ohne Kontamination der Faser extrahiert werden. Der Lithiumchlorid-Gehalt in den Proben betrug entsprechend 0, 2,1 %, 4,2 %, 8,5 % bzw. 12,7 % (M/M). Beginnend mit den Proben mit geringstem Salzgehalt, erfolgte die Anreicherung mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace bei 60°C, wobei die Probe unter Rühren 25 min extrahiert wurde. Die Bestimmung erfolgte mit GC-AED über die Iod-Spur I183 unter Verwendung des in Tab. 24 auf Seite 121 aufgeführten Trennprogramms.

Die Ergebnisse für einige ausgewählte Verbindungen sind in Abb. 30 zusammengefasst. Im untersuchten Bereich von 0 bis 12,7 % ist mit dem Salzgehalt eine Zunahme der extrahierten Stoffmenge zu beobachten. Diese ist bei den alkylierten Verbindungen nur schwach ausgeprägt. Demgegenüber nehmen die Peakflächen bei den nitrierten Derivaten sowie den bicyclischen Verbindungen um durchschnittlich 72 % zu. Diese Resultate stimmen mit den Beobachtungen von KELZ überein, der bei direkter Extraktion mit einer PDMS/DVB-Faser NaCl-Konzentrationen von 0 und 18 g/L verglich [149].

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass infolge der Derivatisierung bereits verschiedene Salze eingebracht wurden. Durch die Salzzugabe wird nach LORD *et al.* die Hydratation der Analyten beeinflusst und eine Verteilung in andere

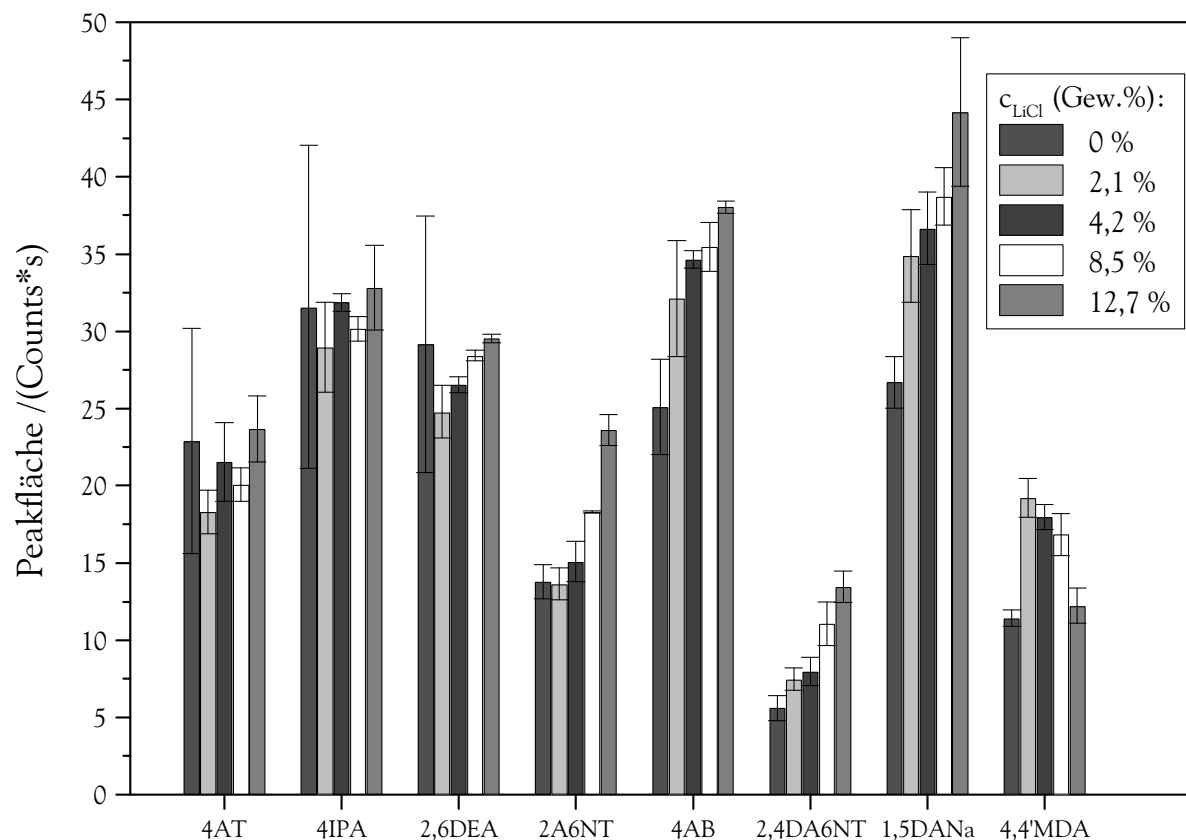


Abbildung 30: Einfluss der Lithiumchlorid-Konzentration auf die extrahierten Stoffmengen. Dargestellt sind die mittleren Peakflächen ausgewählter Analyten für verschiedene Salzkonzentration angegeben in Gewichtsprozenten. Für jede Konzentration wurden 3 Proben mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser bei 60°C aus dem Headspace extrahiert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken aufgeführt.

Phasen begünstigt [99]. Dies macht sich vor allem bei Analyten bemerkbar, bei denen das Gleichgewicht stark auf der Seite der wässrigen Phase liegt. Aus diesem Grunde macht sich der Aussalzeffekt besonders bei den weniger flüchtigen nitrosubstituierten und den bicyclischen Verbindungen bemerkbar. Bei diesen handelt es sich zugleich um die spät eluierenden Verbindungen, da der Dampfdruck gleichfalls einen Einfluss auf die Retentionszeiten bei der Chromatographie besitzt. Der Rückgang der Peakflächen bei hohen Salzkonzentrationen, wie er bei 4,4'MDA zu beobachten ist, kann nach LORD *et al.* auf elektrostatische Wechselwirkungen der Analyten mit den Ionen zurückgeführt werden (vgl. Abb. 30) [99].

Weiterhin ist mit Zunahme des Salzgehalts eine Abnahme der mittleren Relativen Standardabweichungen zu beobachten. Während anfänglich durchschnittlich 18,5 % Relative Standardabweichung auftraten, geht diese bei Salzzugabe stetig auf bis zu 5,2 % bei 8,5 % Lithiumchlorid zurück. Infolge der Derivatisierung können Schwankungen der Zusammensetzung jeder einzelnen Probe auftreten, die bei hohen Salzkonzentrationen weniger ins Gewicht fallen. Besonders bei Realproben lassen sich durch die Zugabe von Salz diese Unterschiede ausgleichen. Obwohl die Vorteile der Salzzugabe bei Extraktion aus dem Headspace überwiegen, wurde für die qualitative Analyse angesichts des zusätzlichen Arbeitsschrittes auf die Salzzugabe verzichtet.

7.3.3.6 Position der SPME-Faser in der Probe

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Position der SPME-Faser in der Probe hat. Dies ist ein Aspekt, der bislang kaum Beachtung gefunden hat, aber besonders für die manuelle Extraktion, bei der die Faser weniger präzise positioniert werden kann, von Bedeutung ist.

Ausgehend von einem Volumen von 10 mL wurden Proben hergestellt, die die Analyten sowie 3C4FA als Internen Standard in einer Konzentration von 2,5 µg/L enthielten. Die Analyten wurden derivatisiert und anschließend mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser für jeweils 30 min direkt extrahiert. Dabei wurde die Faser bei n= 4 Proben mittig positioniert und bei n= 8 Proben das Septum am Rand durchstoßen. Die Messung erfolgte mit GC-AED über die selektive Detektion der Iod-Signale.

Die mittleren Peakflächen der einzelnen Analyten sind in Abb. 31a) mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt. Bei Extraktion am Rand sind die Peakflächen durchschnittlich um etwa 50 % größer als bei Extraktion aus der Mitte. Zurückzuführen ist dies auf die höhere Strömungsgeschwindigkeit am Rand. Folglich ist die Diffusionsschicht geringer und gestattet eine raschere Gleichgewichtseinstellung. Demzufolge ist eine exakte Position der Faser in der Probe zum einen in Hinblick auf die Empfindlichkeit aber auch für die Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung.

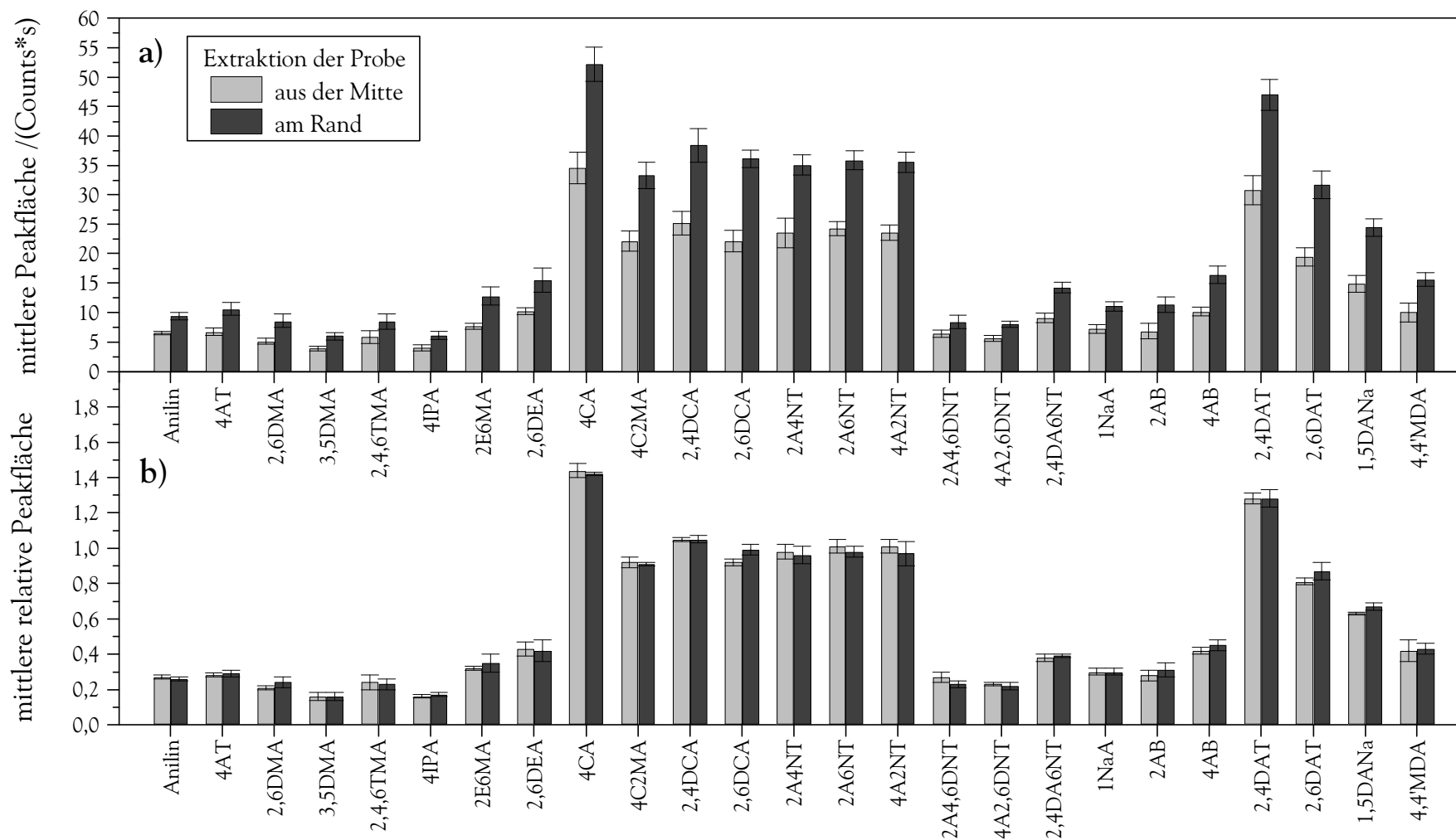


Abbildung 31: Position der Faser in der Probe. Verglichen wurde die Extraktion aus der Mitte ($n= 4$) mit der am Rand ($n= 8$) a) ohne und b) mit Internem Standard. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken aufgetragen. Die direkte Extraktion der Derivate erfolgte mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser für 30 min. Die Analytkonzentration und die des Internen Standards betragen $2,5 \mu\text{g/L}$.

Da in diesem Falle alle Analyten gleichermaßen betroffen sein sollten, wurde die Eignung eines Internen Standards zur Kompensation geprüft. Dazu wurden die Peakflächen der beiden Gruppen auf die von 3C4FA bezogen und die Mittelwerte miteinander verglichen. Die mittleren relativen Peakflächen sind in Abb. 31b) für die einzelnen Analyten dargestellt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung, welche als Fehlerbalken dargestellt ist, lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Demzufolge kann die unterschiedliche Position der SPME-Faser in der Probe sehr gut durch Verwendung eines Internen Standards kompensiert werden.

Dieser macht sich darüber hinaus bei der Reproduzierbarkeit positiv bemerkbar. Während bei Extraktion am Rand ohne Internen Standard die durchschnittliche Relative Standardabweichung 8,5 % beträgt, geht sie durch Verwendung von 3C4FA auf 7,0 % zurück. Somit erweist sich die generelle Verwendung eines Internen Standards, ohne dass eine Ähnlichkeit bzgl. der chemischen Eigenschaften abgesehen vom Anilin-Grundkörper besteht, für alle Analyten von Vorteil. Kompensieren lassen sich so Fehlerquellen, die alle Analyten gleichermaßen betreffen wie beispielsweise eine Veränderung der Extraktionstemperatur oder der Position der Faser im Injektor.

7.3.3.7 Vergleich von direkter Extraktion und Headspace-SPME

In einem abschließenden Vergleich wurden direkte Extraktion und Headspace-SPME unter optimierten Bedingungen gegenübergestellt. Dazu ist es erforderlich, ein Probenvolumen zu wählen, dass gleichermaßen für Headspace und direkte Extraktion geeignet ist. Um die Mengenverhältnisse der Reagenzien bei der Derivatisierung beibehalten zu können, wurde von 5 mL Probe im 17 mL Vial ausgegangen und erst im Anschluss an die Umsetzung (vgl. Kap. 7.1.1) mit 3 mL Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Bei diesem Volumen kann die Faser bei direkter Extraktion auch bei starkem Rühren sicher eintauchen und kommt umgekehrt bei Extraktion aus dem Headspace nicht mit der Flüssigkeit in Kontakt.

Auf diese Weise wurden 13 Proben hergestellt, von denen 7 direkt und 6 aus dem Headspace extrahiert wurden. Die Analyten wurden den Proben zuvor in einer Konzentration

Tabelle 23: Vergleich von *direct*- und *Headspace-SPME* anhand der Peakflächen mit den Relativen Standardabweichungen RSD ohne und mit Internem Standard (in Klammern). Die Derivate sind nach zunehmender Retentionszeit geordnet.

Analyt	direct-SPME ^a			Headspace-SPME ^b		
	Peakfläche /(Counts*s)	RSD /%	(RSD) ^c (/%)	Peakfläche /(Counts*s)	RSD /%	(RSD) ^c (/%)
Anilin	11,17	11,8	(13,0)	12,82	16,0	(13,0)
4AT	7,95	10,3	(8,2)	23,93	9,3	(5,4)
4CA	51,91	14,9	(18,8)	67,47	12,0	(10,2)
3C4FA	28,80	5,7	(10,9)	52,34	9,9	(9,1)
2,6DMA	11,98	5,9	(2,1)	43,11	5,2	(1,7)
3,5DMA	11,46	6,1	(3,2)	49,64	5,1	(1,3)
4IPA	7,70	10,9	(6,8)	40,13	6,5	(2,3)
4C2MA	11,91	5,8	(5,3)	47,99	5,2	(1,5)
2E6MA	9,02	6,9	(5,6)	42,45	4,3	(1,1)
2,4,6TMA	12,02	7,3		58,53	5,0	
2,4DCA	14,43	3,8	(5,4)	54,17	5,2	(2,3)
2,6DEA	6,26	7,5	(2,5)	36,17	5,2	(2,8)
2,6DCA	14,68	3,8	(5,3)	44,13	5,4	(3,7)
2,4DAT	13,22	8,0	(4,9)	57,22	5,0	(4,5)
2,6DAT	22,31	6,8	(2,1)	98,77	4,0	(2,7)
2A6NT	15,89	4,6	(6,4)	10,48	6,6	(5,6)
4A2NT	32,03	42,3	(38,7)	16,95	30,7	(29,0)
1NaA	20,16	13,0	(10,0)	44,02	3,4	(4,0)
2AB	16,34	4,9	(5,8)	48,39	3,2	(4,4)
2A4NT	14,92	5,6	(8,3)	5,48	7,4	(11,2)
4AB	10,90	5,0	(3,4)	25,86	5,4	(6,8)
4A2,6DNT	3,65	9,8	(10,6)			
2,4DA6NT	10,85	4,1	(6,7)	4,06	9,3	(10,5)
2A4,6DNT	4,31	11,9	(7,9)			
1,5DANa	17,88	4,9	(5,1)	33,63	3,9	(6,6)
4,4'MDA	9,25	7,9	(7,9)	15,73	9,2	(10,9)

^a Mittelwert von n= 7 bzw. ^b n= 6 Bestimmungen; in beiden Fällen 25 min Extraktion mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser, ^a bei 27°C, ^b bei 60°C; ^c mit 2,4,6TMA als Interner Standard; Ausgangskonzentration aller Analyten 2,5 µg/L, 10 mL Probevolumen im 17 mL Vial nach Derivatisierung.

von 2,5 $\mu\text{g/L}$ zugegeben. In beiden Fällen wurde mit derselben 65 μm PDMS/DVB-Faser 25 min extrahiert. Vor der Extraktion wurden die Proben 4 min im Wasserbad thermostatisiert. Die Anreicherung erfolgte bei direkter Extraktion bei Raumtemperatur und aus dem Dampfraum bei 60°C. Die Faser wurde dazu am Rand des Septums eingebracht (vgl. Kapitel 7.3.3.6) und die Proben mit 1250 U/min intensiv gerührt. Die Bestimmung erfolgte anschließend mit GC-AED über die Iod-Spur I183 unter den in Tab. 24 auf Seite 121 aufgeführten Bedingungen.

Die mittleren Peakflächen für die direkte und die Headspace-Extraktion sind in Tab. 23

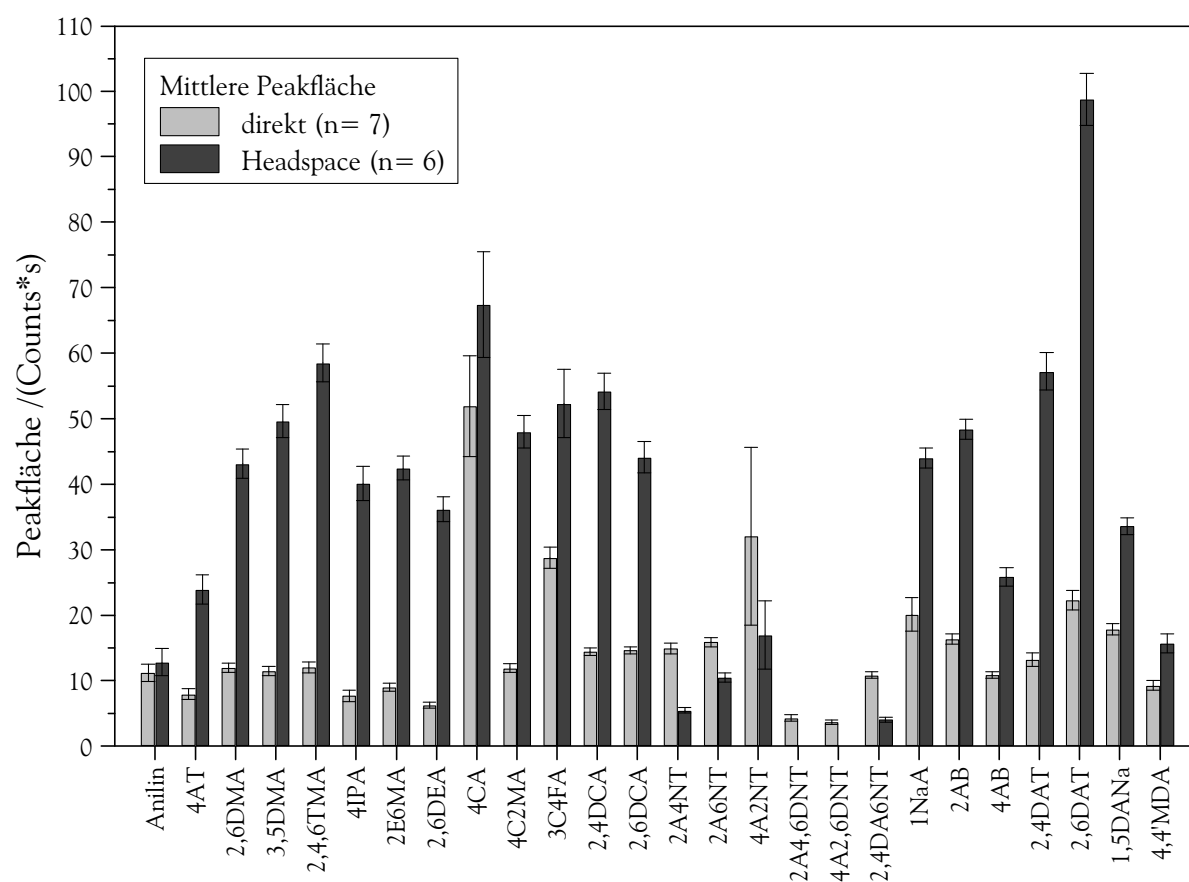


Abbildung 32: Vergleich von direkter und Headspace-Extraktion. Dargestellt sind die mittleren Peakflächen der Analyten für $n=7$ (direct-SPME) bzw. $n=6$ Extraktionen (Headspace-SPME) mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken. Bei direkter Extraktion wurden die Proben bei 27°C angereichert, aus dem Headspace bei 60°C. In beiden Fällen wurden 10 mL Probe 25 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert.

zusammen mit den Relativen Standardabweichungen RSD aufgeführt. Zum besseren Vergleich sind die mittleren Peakflächen der Analyten in Abb. 28 für direkte Extraktion und Headspace-SPME nebeneinander aufgetragen. Zusätzlich sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt. Für die Mehrzahl der Analyten werden bei der Headspace-Extraktion deutlich bessere Resultate erzielt. Diese liegen im Durchschnitt um Faktor 2,7 über der direkten Extraktion. Ausnahmen bilden nur die nitrosubstituierten Analyten. Die Derivate der Aminodinitrotoluole waren im Headspace nicht nachweisbar und die Aminonitrotoluole sowie 2,4DA6NT erreichen verglichen mit der direkten Extraktion lediglich 48 %.

Die Unterschiede sind weniger auf höhere Verteilungskoeffizienten K_{fs} sondern vielmehr auf die raschere Äquilibrierung bei 60°C zurückzuführen. Während bei direkter Extraktion für viele der Verbindungen das Gleichgewicht nach 25 min noch nicht erreicht ist (vgl. Tab. 37 auf Seite 182), erfolgt bei 60°C für viele der Derivate die Anreicherung bereits unter Gleichgewichtsbedingungen (vgl. Tab. 22 auf Seite 108). Da bei der Extraktionstemperatur ein Maximum durchlaufen wird, werden die größten Verhältnisse von Headspace- zu direkter Extraktion mit Verbindungen erzielt, deren Temperaturoptimum im Bereich von 60°C liegt (vgl. Kapitel 7.3.3.3). Dazu zählen neben den Derivaten der beiden Diaminotoluole und Dichloraniline die alkylierten aromatischen Amine.

7.3.3.8 Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse des Vergleichs von direkter und Headspace-Extraktion wurden herangezogen, um die Reproduzierbarkeit der manuellen Extraktion zu beurteilen. Dazu wurden die Relativen Standardabweichungen RSD in Tab. 23 für $n=7$ (direct-SPME) bzw. $n=6$ Messungen (Headspace-SPME) verwendet.

Bei manueller Extraktion betragen die Relativen Standardabweichungen durchschnittlich 8,8 %. Abgesehen von 4A2NT, das aufgrund starken Tailings verbunden mit Koelution bei dieser Messreihe nur schlechte Resultate erzielte, liegen die Relativen Standardabweichungen unter 15 %. Insgesamt ist die Reproduzierbarkeit bei Anreicherung aus dem

Headspace mit durchschnittlich 7,6 % besser. Lediglich Anilin, 4CA und 4A2NT weisen Relative Standardabweichungen über 10 % auf. Obwohl sich bei manueller Extraktion die Extraktions- und Desorptionszeit weniger genau einhalten lässt und die exakte Positionierung der Faser schwieriger ist, werden für viele Analyten sehr gute Reproduzierbarkeiten erzielt. Dabei ist zu bedenken, dass angesichts der großen Zahl an Analyten die Extraktionsbedingungen stets einen Kompromiss darstellen. Die Reproduzierbarkeiten sind mit den Werten vergleichbar, die von SAKAMOTO *et al.* für die Extraktion von Pestiziden ähnlicher Flüchtigkeit mit einem automatisierten System beschrieben wurden [316].

Diese Resultate sind wesentlich mit der Extraktionstemperatur verbunden: Zu der guten Reproduzierbarkeit der direkten wie der Headspace-Extraktion trägt der verwendete Aufbau bei, bei dem durch Rühren das Wasserbad gleichmäßig thermostatisiert werden kann. Da der verwendete Heizrührer in Intervallen heizt und dabei stets große Wärmemengen freisetzt, lassen sich höhere Temperaturen besser einstellen, wohingegen bei niedrigen stärkere Schwankungen auftreten. Bei Raumtemperatur führt das Rühren der Probe bei hoher Umdrehungszahl zudem zu einer allmählichen Erwärmung des Wasserbades. Darüber hinaus muss als wesentlicher Unterschied zwischen direkter Extraktion und Headspace-SPME die Bedeutung der Temperatur auf die Gleichgewichtseinstellung berücksichtigt werden. Während bei Raumtemperatur die Anreicherung noch nicht unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgt, befinden sich bei 60°C bereits viele Analyten im Gleichgewicht. Dadurch verlieren Schwankungen der Extraktionszeit sowie Unterschiede bei der Durchmischung der Probe und Positionierung der Faser an Bedeutung und erklären die bessere Reproduzierbarkeit der Headspace-Extraktion.

Außerdem sind in Tab. 23 die Relative Standardabweichungen unter Verwendung eines Internen Standards in Klammern aufgeführt. Wie die Ergebnisse am Beispiel von 2,4,6TMA als Internem Standard zeigen, lassen sich mit einer geeigneten Verbindung die Relativen Standardabweichungen weiter verbessern. Temperaturschwankungen und eine Veränderung der Faserkapazität lassen sich auf diese Weise ausgleichen. Während die Relative Standardabweichung bei direkter Extraktion auf durchschnittlich 8,1 % zurückgeht, lassen sich bei Headspace-SPME im Mittel 6,5 % erzielen. Dabei spielt die Art des

Internen Standards eine Rolle, denn eine Verbesserung ist für all die Verbindungen zu beobachten, die ähnliche Retentionszeiten aufweisen wie der Interne Standard, wohingegen 2,4,6TMA für einige Verbindungen wie 2AB, 2A4NT und 1,5DANa von Nachteil ist. Folglich empfiehlt sich für optimale Ergebnisse die Verwendung mehrerer Interner Standards.

7.3.4 Aromatische Amine in Proben von Rüstungsaltslasten

Das Verfahren wurde auf Rüstungsaltslasten angewendet, deren Abwasser auf aromatische Amine untersucht wurde. Die Proben wurden von Prof. Engewald zur Verfügung gestellt und stammten von der Rüstungsaltslast Elsnig. Hier wurden während des 2. Weltkrieges von der Westfälisch-Anhaltinischen Sprengstoff AG (WASAG) auf einem 700 ha großen Gelände in etwa 7000 Gebäuden monatlich bis zu 2950 t Sprengstoff produziert. Aufgrund der Bedeutung der Region für die Trinkwassergewinnung wurde der Standort in der Vergangenheit intensiv erforscht und eine Vielzahl von Verbindungen nachgewiesen. Zur Zeit laufen Projekte zur Aufbereitung des kontaminierten Wassers. Das Drainagewasser wird dazu in einer Pilotanlage zunächst durch Adsorption an einem Polymer mit räumlich globularer Struktur (RGS-Polymer) gereinigt. Das Material wird anschließend mit Methanol regeneriert und in einer zweiten Stufe das Lösungsmittel mit den Sprengstoff-Verbindungen mikrobiologisch abgebaut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob nach Durchlaufen der Anlage noch aromatische Amine nachgewiesen werden können. Dazu wurde Drainagewasser vor Passieren der Anlage (Rohwasser 227-110-00, Rohwasser UTT 08102003, Rohwasser UTT Probe 2) sowie nach mikrobiologischem Abbau unter aeroben (Bioabbau 2003 11 21 - 13.46, Bioabbau 2003 11 19 - 13.43) bzw. anaeroben Bedingungen (Bioabbau 2003 11 21 - 14.46, Bioabbau 2003 11 19 - 14.43, Bioabbau 2003 11 19 - 14.44) untersucht. Alternativ zum RGS-Polymer erfolgt die Aufbereitung in einer anderen Anlage über ein Aktivkohle-Mehrschichtfilter, von der eine Probe nach dem Passieren zur Verfügung stand (Rohwasser n.MF HGN 08102003).

Die aromatischen Amine entstehen im Boden durch mikrobiologischen Abbau. Ihrer Überwachung kommt besondere Bedeutung zu, da sie verglichen mit den Ausgangsverbindungen deutlich polarer sind und schlechter von Adsorbentien zurück gehalten werden. Da am Standort Elsnig vorwiegend TNT produziert wurde, konzentrieren sich die Untersuchungen auf Abbauprodukte des 2,4,6-Trinitrotoluols sowie der als Nebenprodukte anfallenden Dinitrotoluole, Nitrotoluole, Trinitrobenzole und Dinitrobenzole.

Es wurde ein Standard in Methanol hergestellt, der 19 aromatische Amine in einer Konzentration von 10 mg/L enthielt. Zur Methodenentwicklung wurden 10 mL Wasser mit

Tabelle 24: Parameter zur Trennung und Detektion nitroaromatischer Amine nach Derivatisierung-SPME mit GC-AED

Gerät	GC-AED mit HP 6890 und AED G 2350
Trennsäule	Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Injektor	Split/splitless mit 0,8 mm SPME-Liner
Injektortemperatur	250°C isotherm
Split	nach 4 min Splitventil öffnen (Verhältnis 1:20)
GC-Programm	40°C für 3 min, mit 30°C/min auf 110°C heizen, mit 5°C/min auf 180°C heizen, mit 30°C/min auf 260°C heizen, 1 min halten (Gesamtdauer: 23 min)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
Detektion	Elementspuren I183, C179, C193 Reaktandgase: O ₂ : 15 psi, H ₂ : 10 psi, Makeup-Flow: 43 mL/min Helium Supply Pressure: 30 psi, Cavity Pressure: 2,0 psi Cavity-, Transferline-Temperatur: 250°C, 260°C

250 µL des Standards sowie jeweils 100 µL IPFB (50 mg/L), 2TFMIB (50 mg/L), 3C4FA (25 mg/L) und 2F5NA (25 mg/L) versehen. Die Lösung wurde derivatisiert und mit 1 mL *n*-Hexan extrahiert. Die Derivate wurden unter Verwendung einer Stx-CLPesticides-Säule mittels GC-AED getrennt und über die Iod-Spur I183 detektiert. Abb. 33 zeigt ein Chromatogramm, das unter den in Tab. 24 aufgeführten Bedingungen aufgenommen wurde. Aufgegeben wurde dazu jeweils 1 µL des Hexan-Extraktes. Die untersuchten Verbindungen mit den verwendeten Abkürzungen sind in Tab. 25 angegeben. Angesichts vieler Isomere und einer engen strukturellen Verwandtschaft der Verbindungen ist die Trennung als sehr gut zu bezeichnen. Auch bei den nitroaromatischen Aminen ist durchweg eine gute Peakform mit schmalen Signalen und wenig Tailing zu beobachten. Die Einstellungen für Trennung und Detektion wurden ohne Veränderungen für die Festphasenmikroextraktion übernommen.

Die Extraktion der Derivate erfolgte mit SPME direkt aus der Probe, da die nitrosu-

stituierten Verbindungen weniger gut für die Extraktion aus dem Headspace geeignet waren. Die Probe wurde dazu mit 1250 U/min gerührt und mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser 30 min extrahiert. Für die Zuordnung der Signale unbekannter Proben wurden die Peaks mit einem Standard verglichen, der in gleicher Weise derivatisiert und extrahiert wurde. Standard wie Realprobe wurden zuvor mit verschiedenen Internen Standards in Konzentrationen von 2,5 $\mu\text{g/L}$ (3C4FA, 2F5NA) bzw. 5 $\mu\text{g/L}$ (IPFB, 2TFMIB) versetzt. Verschiebungen der Retentionszeiten, wie sie durch verzögertes manuelles Starten des GC-Laufs auftreten konnten, ließen sich kompensieren, indem die Retentionszeiten relativ zu den Internen Standards verglichen wurden. Zudem konnten so für Proben, in denen keine aromatischen Amine gefunden wurden, Fehler bei Derivatisierung (3C4FA,

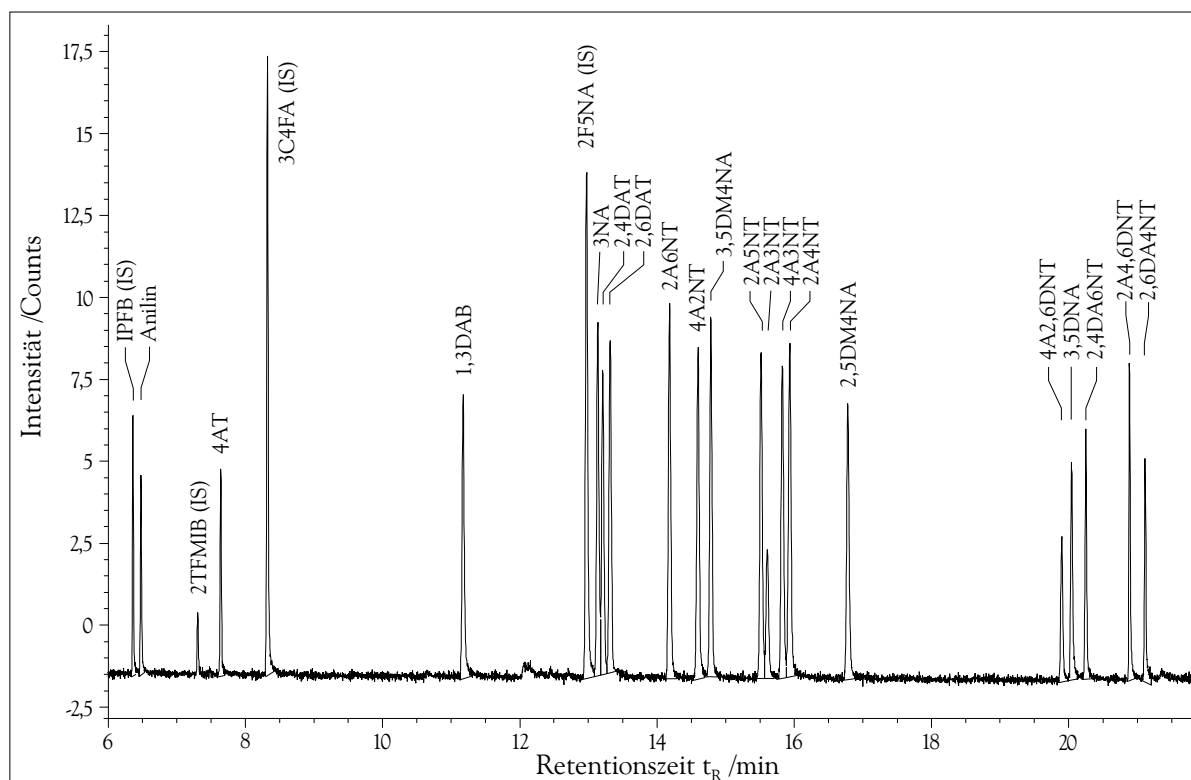


Abbildung 33: Chromatogramm eines Standards der untersuchten Verbindungen nach Derivatisierung und Extraktion mit *n*-Hexan. Die Trennung erfolgte mit einer Stx-CLPesticides Säule unter den in Tab. 24 abgedruckten Bedingungen. Von jedem Derivat wurden zwischen 3,9 und 7,6 ng aufgegeben. Gezeigt ist die Iod-Spur I183 für die 23 in Tab. 25 aufgeführten Verbindungen

Tabelle 25: Retentionszeiten der Derivate nitroaromatischer Amine für das Screening von Rüstungsaltslasten. Angegeben sind die Ausgangsverbindungen vor Derivatisierung

Analyt	Abkürzung	t_R /min^a
Iodpentafluorbenzol (IS)	IPFB	6,33
2-Trifluormethyliodbenzol (IS)	2TFMIB	7,27
Anilin	A	6,45
4-Aminotoluol	4AT	7,61
3-Chlor-4-fluoranilin (IS)	3C4FA	8,29
3-Nitroanilin	3NA	13,08
3,5-Dinitroanilin	3,5DNA	19,99
2-Fluor-5-nitroanilin (IS)	2F5NA	12,91
2-Amino-3-nitrotoluol	2A3NT	15,54
2-Amino-4-nitrotoluol	2A4NT	15,87
2-Amino-5-nitrotoluol	2A5NT	15,45
2-Amino-6-nitrotoluol	2A6NT	14,13
4-Amino-2-nitrotoluol	4A2NT	14,54
4-Amino-3-nitrotoluol	4A3NT	15,76
2,5-Dimethyl-4-nitroanilin	2,5DM4NA	16,71
3,5-Dimethyl-4-nitroanilin	3,5DM4NA	14,72
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	2A4,6DNT	20,85
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	4A2,6DNT	19,85
2,4-Diamino-6-nitrotoluol	2,4DA6NT	20,21
2,6-Diamino-4-nitrotoluol	2,6DA4NT	21,08
1,3-Diaminobenzol	1,3DAB	11,13
2,4-Diaminotoluol	2,4DAT	13,16
2,6-Diaminotoluol	2,6DAT	13,27

^a Messbedingungen vgl. Tab. 24.

2F5NA) bzw. Extraktion (IPFB, 2TFMIB) als Erklärung ausgeschlossen werden. Eine Substanz galt als identifiziert, wenn sie gegenüber dem Standard eine Abweichung von maximal $\pm 0,01$ min zeigte.

Zudem wurde das Verfahren auf Störpeaks untersucht. Ein Blank, bestehend aus einer Wasserprobe, die nicht derivatisiert aber in gleicher Weise extrahiert wurde, zeigte lediglich einige sehr kleine Systempeaks (vgl. Abb. 34e). Die Chromatogramme des Standards und der Blindprobe lassen erkennen, dass keinerlei Artefakte der Derivatisierung auftreten, die das Verfahren stören. (vgl. Abb. 34a und c). Nahezu alle Peaks der Iod-Spur I183 ließen sich auf Verbindungen zurückführen, die der Probe zuvor zugesetzt wurden. Darüber hinaus wurden die Realproben auch ohne Derivatisierung auf bereits enthaltene Iod-Verbindungen untersucht. In allen Proben wurden allenfalls kleine Peaks beobachtet, die die Identifikation aromatischer Amine nicht beeinträchtigten.

Auf diese Weise wurden die genannten Proben der Rüstungsalzlast Elsnig sowie zwei Proben vom Standort Stadtallendorf (ASB 3 und P 2) untersucht. Abgesehen von einigen kleinen Peaks lassen sich alle Signale anhand der Retentionszeit zuordnen (vgl. Abb. 34 und Anhang 12 auf Seite 275). Die Selektivität der Iod-Detektion mindert zudem das Risiko einer fehlerhaft positiven Identifikation. Die Ergebnisse sind in Tab. 26 zusammengefasst. Besonders häufig wurden nitrierte Verbindungen nachgewiesen, während vollständig reduzierte selten auftraten. Auf Xylol basierende aromatische Amine konnten dagegen nicht identifiziert werden. Unter den Aminonitrotoluolen dominierten solche Verbindungen, bei denen die Amino- und Nitrogruppe infolge der Produktionsbedingungen metaständig sind (vgl. Abb. 34 b).

In den Bioabbau-Proben konnten keinerlei aromatische Amine nachgewiesen werden. Darüber hinaus traten keine neuen Verbindungen durch (unvollständigen) Abbau auf. Interessanterweise scheint der Aktivkohle-Mehrschichtfilter nicht in der Lage zu sein, die aromatischen Amine vollständig zu entfernen. Die beiden isomeren Aminodinitrotoluole sowie 2A6NT und 4A2NT sind deutlich zu erkennen (vgl. Anhang 12.2 ab Seite 282).

Die Bestimmung der nachgewiesenen aromatischen Amine erfolgte in Kap. 7.4.5.

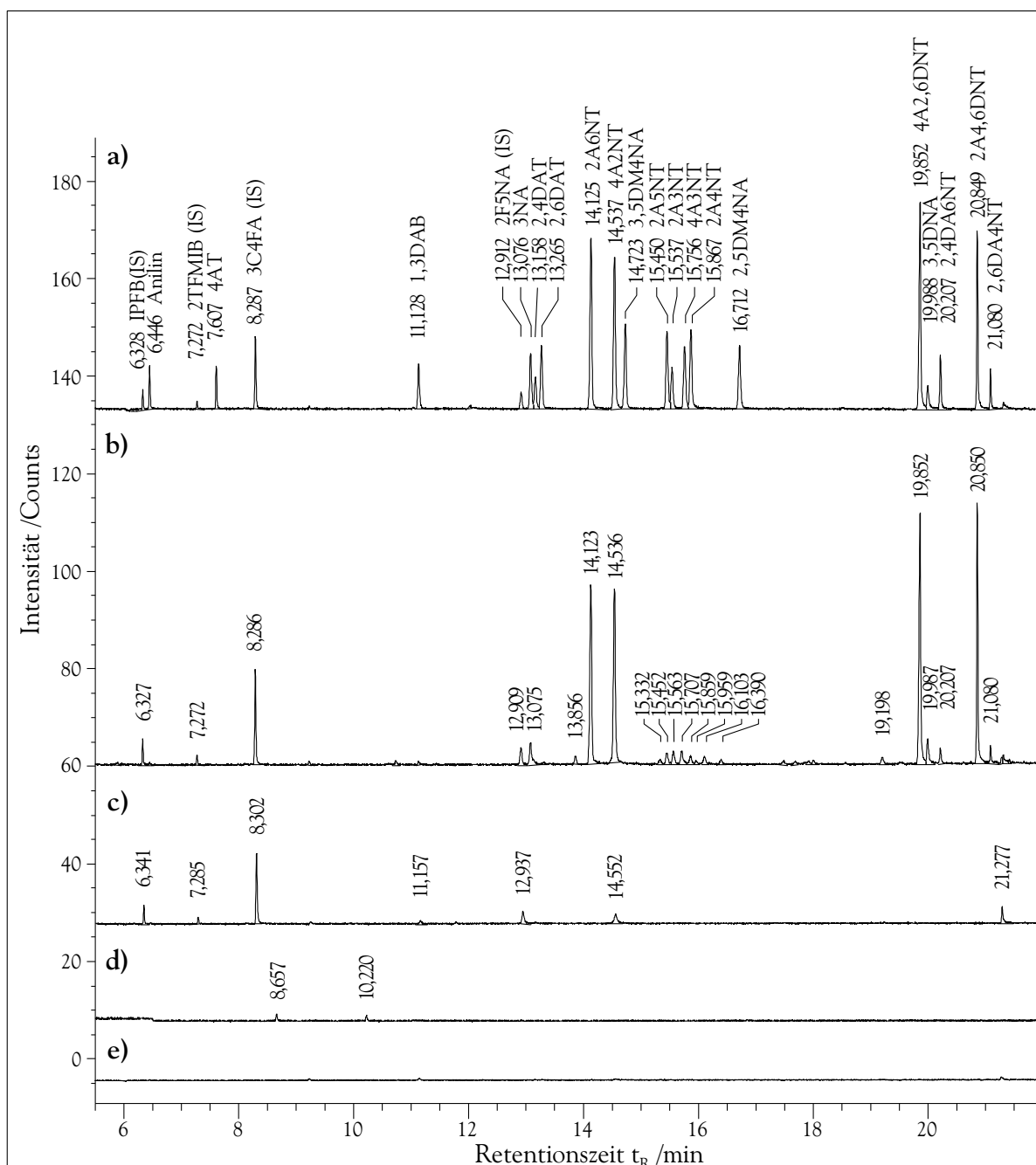


Abbildung 34: Chromatogramm a) eines Standards nitroaromatischer Amine, b) einer Realprobe (Rohwasser 227 - 110 - 00), c) einer Blindprobe, d) der gleichen Realprobe ohne Derivatisierung und e) eines Blanks. Die Proben in a) - c) wurden mit 3C4FA, 2F5NA, IPFB und 2TFMIB versetzt und derivatisiert. Bei d) und e) erfolgte keine Derivatisierung. Alle Proben wurden 30 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Trennung erfolgte unter den in Tab. 24 aufgeführten Bedingungen. Dargestellt ist die Iod-Spur I183. Alle 5 Chromatogramme sind gleich skaliert und lediglich vertikal gegeneinander verschoben.

Tabelle 26: Übersicht über die in Realproben nach Derivatisierung mit SPME-GC-AED nachgewiesenen aromatischen Amine

Analyt	t _R /min	Rohwasser 227 - 110 - 00	Rohwasser UTT Probe 2	Rohwasser UTT 08 10 2003	Rohwasser n. MF HGN 08 10 2003	Bioabbau 2003 11 21 - 13,46	Bioabbau 2003 11 21 - 14,46	Bioabbau 2003 11 19 - 13,43	Bioabbau 2003 11 19 - 14,43	Bioabbau 2003 11 19 - 14,44	ASB 3 2002 02 06	P 2 2002 02 06
Anilin	6,45	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓	nn
4AT	7,61	nn	nn	nn	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
1,3DAB	11,13	nn	nn	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	✓	nn
2,4DAT	13,16	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
2,6DAT	13,27	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
3NA	13,08	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
3,5DNA	19,99	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
2A3NT	15,54	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
2A4NT	15,87	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
2A5NT	15,45	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
2A6NT	14,13	✓	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
4A2NT	14,54	✓	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
4A3NT	15,76	nn	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
2,5DM4NA	16,71	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
3,5DM4NA	14,72	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
2A4,6DNT	20,85	✓	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	✓	✓
4A2,6DNT	19,85	✓	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	✓	✓
2,4DA6NT	20,21	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	✓
2,6DA4NT	21,08	✓	✓	✓	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn

nn - nicht nachgewiesen; Messbedingungen vgl. Tab. 24.

7.3.5 Aromatische Amine im Urin

Im weiteren wurde das Verfahren auf komplexere Matrices erweitert. Angesichts der Toxizität der Verbindungen in Kombination mit diversen Quellen entfällt ein Großteil der Literatur auf die Bestimmung aromatischer Amine in Blut und Urin. Da letzterer leichter und in größeren Mengen verfügbar ist, bietet sich Urin für die Übertragung des Verfahrens auf biologische Matrices an. Die allgemeine Vorgehensweise wird an dieser Stelle vorgestellt und im folgenden Kapitel die einzelnen Schritte näher erläutert, bevor in den Kapiteln 7.3.5.5, 7.3.5.6 und 7.3.5.7 Anwendungen gezeigt werden.

Da die Amine zumeist als Addukte vorliegen (vgl. Kap. 2), muss die bisherige Pro-

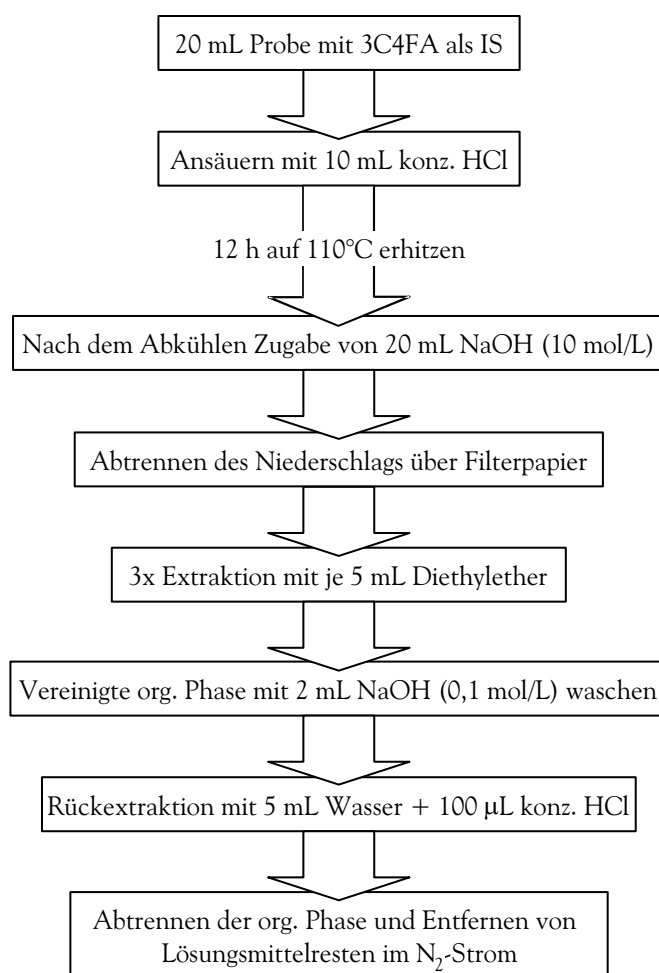


Abbildung 35: Vorbereitung der Urinproben durch Hydrolyse, Filtration und Flüssig-flüssig-Extraktion mit Rückextraktion.

benvorbereitung (vgl. Kap. 7.1.1) entsprechend ergänzt werden (vgl. Abb. 35). Für die Hydrolyse wurden zunächst 20 mL Urin, der mit 25 ng 3C4FA als Internem Standard versehen wurde, mit 10 mL konz. Salzsäure angesäuert und im gut verschlossenen Vial 12 h bei 110°C erhitzt. Die Lösungen verfärbten sich rasch dunkel und es entstand ein feiner schwarzer Niederschlag, der teilweise an der Oberfläche schwamm und nur schwer durch Zentrifugieren abgetrennt werden konnte.

Um die Identifizierung der Amine zu erleichtern, wurde ein Großteil der Matrixverbindungen durch LLE abgetrennt, wobei die Basizität der Amine ausgenutzt wurde. Dazu wurde die Probe zunächst durch Zugabe von 20 mL Natronlauge (10 mol/L) alkalisch gemacht. Der pH-Wert der Lösung betrug etwa 12,5, so dass die Amine in ihrer ungeladenen Form vorlagen. Dabei bildete sich weiterer Niederschlag, der bei der Extraktion stört und über ein Papierfilter abgetrennt wurde. Anschließend wurde die Probe 3x mit jeweils 5 mL Diethylether extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte dabei mitunter nur langsam. Die vereinigten organischen Phasen wurden nochmals mit 2 mL Natronlauge (0,1 mol/L) gewaschen, bevor die Amine zurück in die wässrige Phase extrahiert wurden. Dazu wurde der Diethylether mit 5 mL Wasser und 100 µL konz. Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen und verbliebener Diethylether bei 60°C 5 min im Stickstoff-Strom ausgetrieben. Der Ether stört bei der anschließenden Derivatisierung, da sich das Iod sehr gut darin löst. Mit der Flüssig-flüssig-Extraktion ist eine weitere Aufkonzentrierung der Proben um Faktor 4 verbunden. Die Extraktion dient jedoch in erster Linie der selektiven Abtrennung der aromatischen Amine von Matrixbestandteilen.

Nach dieser erweiterten Probenvorbereitung ließ sich die Derivatisierung, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, durchführen. Anschließend wurden die Derivate durch Headspace-SPME mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser bei 60°C extrahiert (vgl. Tab. 20 auf Seite 97) und mit GC-AED bestimmt (vgl. Tab. 24 auf Seite 121). Soweit nicht anders beschrieben, werden im folgenden alle Proben wie in Abb. 35 dargestellt hydrolysiert und ausgeschüttelt.

7.3.5.1 Probenahme und Aufbewahrung

Da die Probenahme in der Literatur höchst unterschiedlich beschrieben ist, wurden verschiedene Ansätze aufgegriffen. Während die Proben meist ohne weitere Zusätze gekühlt gelagert werden, werden die Proben bei Untersuchung von Diaminotoluolen vor dem Einfrieren angesäuert [23–26]. GRIMMER *et al.* weisen darauf hin, dass bei der Probenahme eine Stabilisierung der Amine durch Zugabe von 4AT erforderlich ist [40]. Dies könnte erklären, warum WEISS *et al.* nur in einer Probe 4AB und in keiner der 200 untersuchten Urinproben 1NaA nachweisen konnten [60]. Auch RIFFELMANN *et al.* konnten nur in einer von 45 Urinproben 4AB nachweisen, wohingegen die Bestimmung über die Hämoglobin-Addukte im Blut keine Probleme bereitete [57].

Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Probenahmen verglichen. In Anlehnung an SKARPING *et al.* [23] und GRIMMER *et al.* [40] wurden in den verwendeten Probenahmefläschen vor der Entnahme 5 mL Salzsäure (6 mol/L) je 100 mL Urin bzw. 5 mL Salzsäure (6 mol/L) mit 50 µg 4AT vorgelegt und mit einer Probe ohne Zusätze verglichen. Die drei Proben wurden unmittelbar nacheinander entnommen, danach eingefroren und bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung wurden von dem Urin nach dem Auftauen jeweils 20 mL entnommen, mit 10 mL konz. Salzsäure, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert und anschließend extrahiert. Nach Derivatisierung wurden die Verbindungen mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser 25 min bei 60°C aus dem Headspace angereichert.

Abb. 36 zeigt die mit GC-AED aufgezeichneten Chromatogramme der Iod-Spur I183. In allen Proben treten die gleichen Peaks unabhängig von der Probenvorbereitung auf. Unter den gewählten Bedingungen scheint die Probenvorbereitung keine maßgebliche Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu WEISS *et al.* [60] und RIFFELMANN *et al.* [57] sind in allen drei Fällen sowohl 2NaA als auch 2AB und 4AB deutlich und ohne gravierende Unterschiede bei der Peakhöhe zu erkennen. Aus diesem Grunde finden sich in den folgenden Kapiteln Beispiele für die drei beschriebenen Probenvorbereitungen. Unterschiede bei den Peakgrößen sind auf Schwankungen der Zusammensetzung bei der Entnahme zurückzuführen. Diese waren bei der beschriebenen Vorgehensweise unvermeidlich, bei der durch sofortiges Ansäuern eine Reaktion unterdrückt werden sollte.

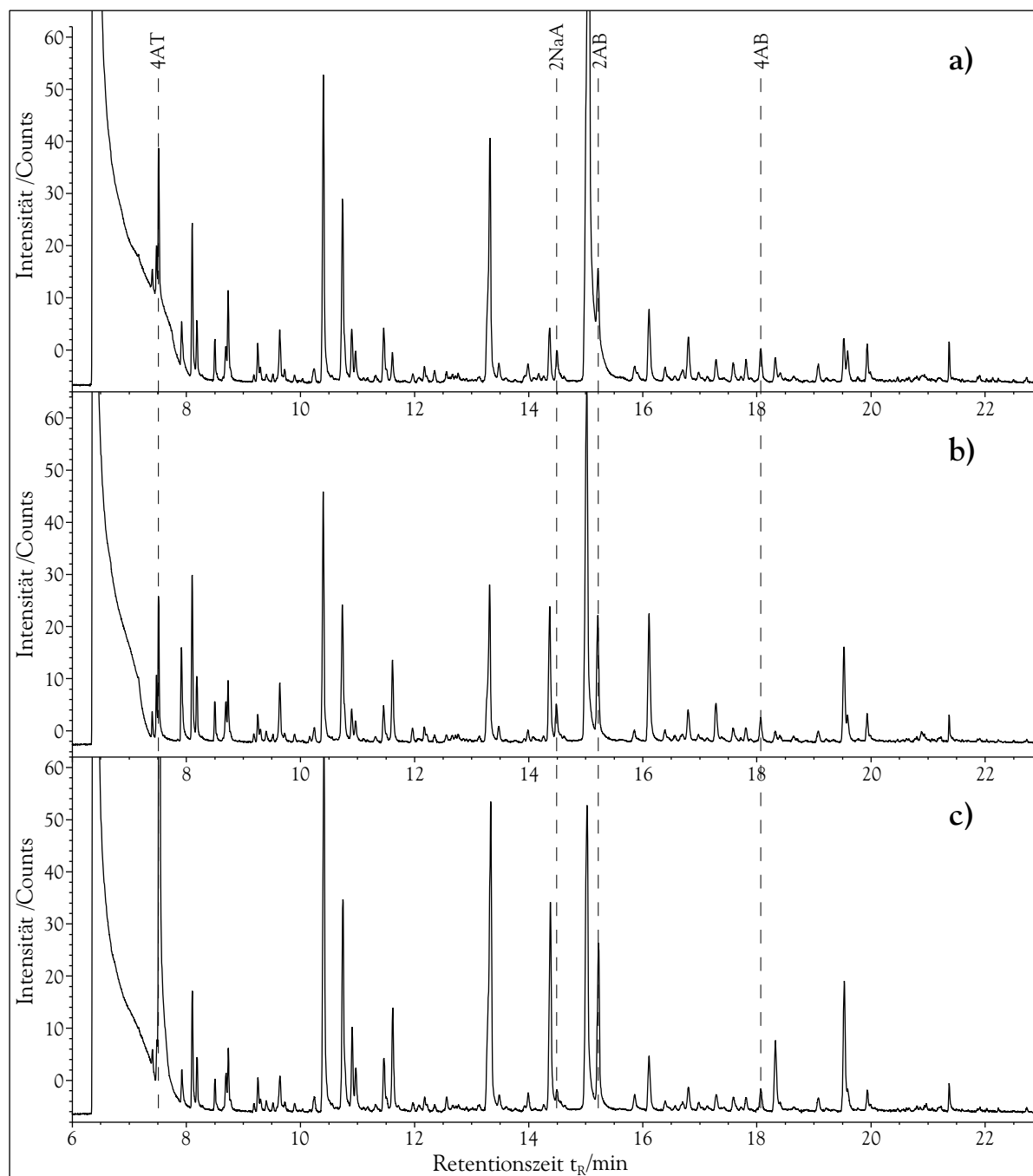


Abbildung 36: Einfluss der Probenvorbereitung auf die Stabilität aromatischer Amine in Urin. Die Proben wurden bei der Entnahme a) nicht behandelt, b) mit 5 mL HCl (6 mol/L) bzw. c) 5 mL HCl (6 mol/L) und 50 μg 4AT je 100 mL Urin versetzt und anschließend bei -20°C gelagert. Die Bestimmung erfolgte mit GC-AED nach Hydrolyse, LLE, Derivatisierung und Headspace-SPME.

7.3.5.2 Hydrolyse

Zur Spaltung der Addukte aromatischer Amine in Urin (vgl. Kap. 2) werden in der Literatur vorwiegend eine saure [15, 19, 20, 23, 25, 26, 57, 61, 81] aber auch eine basische [22, 24, 27, 55, 82] und selten eine enzymatische Hydrolyse [40, 66] mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase verwendet. Da die Derivatisierung bereits im sauren Milieu stattfindet, wurde untersucht, ob eine Hydrolyse unter diesen Bedingungen noch erforderlich ist. Nach Einstellen des pH-Werts wird bei saurer bzw. basischer Hydrolyse die Probe in der Regel 2 h auf 80°C erwärmt. Weil SKARPING *et al.* bei saurer Hydrolyse in Salzsäure (4 mol/L) auch nach 240 h bei 100°C noch kein Maximum erreichten [23], wurden die Proben 12 h bei 110°C hydrolysiert.

Dazu wurden 20 mL der Urinprobe eines Rauchers mit 3C4FA als Internem Standard versehen. Nach Ansäuern mit 10 mL konz. Salzsäure wurde die Probe, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert und danach extrahiert und derivatisiert. Zum Vergleich wurden 5 mL der gleichen Probe ebenfalls mit 3C4FA versehen und ohne Probenvorbereitung auf die gleiche Weise derivatisiert. Beide Proben wurden bei 60°C 25 min mit einer 65 μ m PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert.

In Abb. 37 werden die Chromatogramme der Iod-Spur I183, die mit GC-AED aufgenommen wurden, verglichen. Ungeachtet des 4fach höheren Probevolumens mit Hydrolyse sind die Peaks in diesem Fall unverhältnismäßig groß. Ohne Hydrolyse sind, abgesehen vom Internen Standard 3C4FA, nur die in Abb. 37b) in hoher Konzentration enthaltenen Verbindungen erkennbar. Eine Hydrolyse ist folglich auch bei dieser Methode zwingend erforderlich. Zudem scheinen alle aromatischen Amine unabhängig von der Struktur in irgendeiner Weise gebunden vorzuliegen, da nahezu keine freien Aniline detektiert wurden.

Beim Vergleich von saurer und basischer Hydrolyse fanden SKARPING *et al.* bei basischer Hydrolyse zweimal mehr 2,4- und 2,6DAT als nach saurer [23, 317]. Da acylierte Verbindungen unter beiden Bedingungen gespalten werden können, wurde die Eignung der basischen mit der sauren Hydrolyse verglichen.

Jeweils 5 mL einer Urinprobe, versehen mit 2,5 μ g/L 3C4FA, wurden dazu einerseits mit

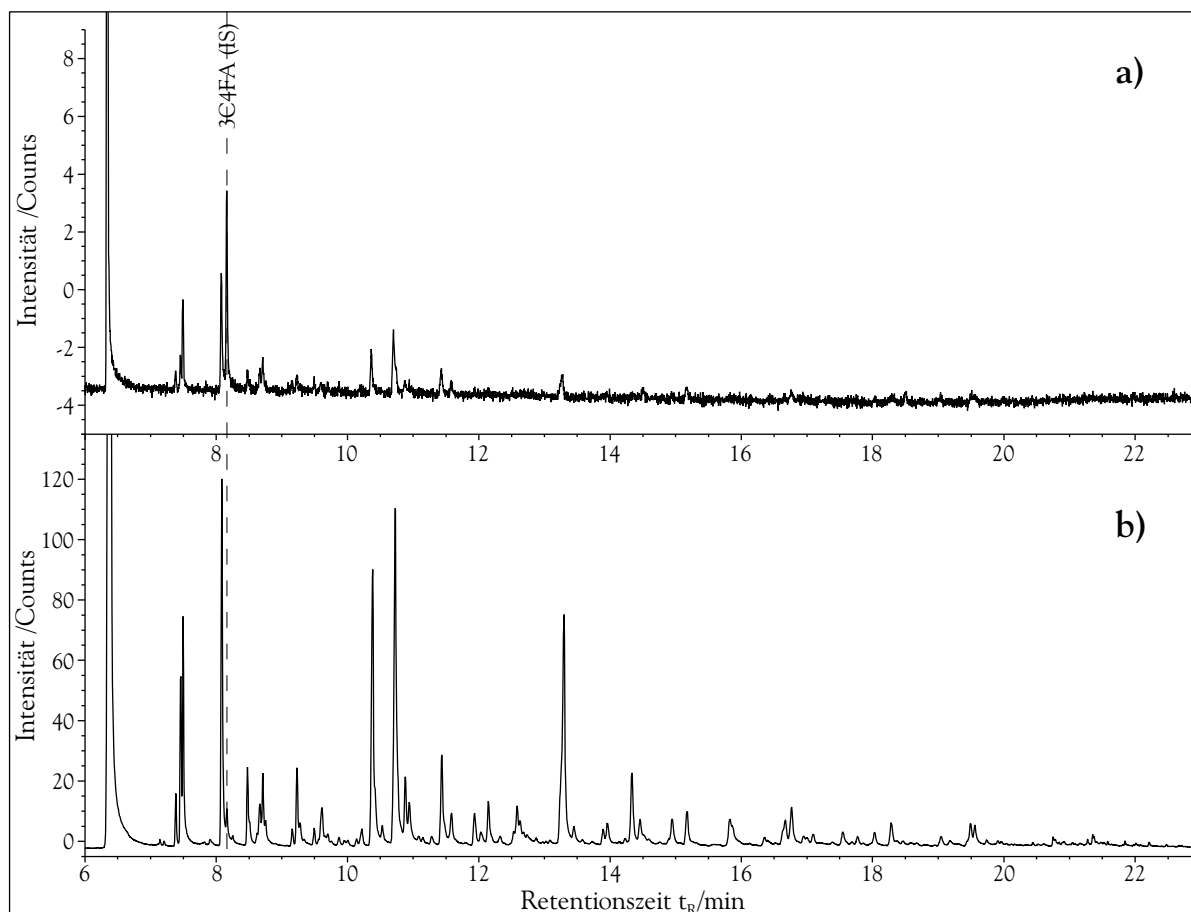


Abbildung 37: Bestimmung aromatischer Amine in Urin a) ohne und b) mit Hydrolyse. Dazu wurden 20 mL Probe mit 10 mL konz. HCl versetzt und 12 h auf 110°C erhitzt. Anschließend wurden beide Proben vor der Bestimmung mit GC-AED ausgeschüttelt, derivatisiert und mittels Headspace-SPME extrahiert. Chromatogramm a) ist gegenüber b) um Faktor 10 vergrößert.

5 mL Salzsäure (6 mol/L) und zum anderen mit 5 mL Natronlauge (10 mol/L) versetzt. Die Proben wurden 12 h bei 110°C erhitzt, nach dem Abkühlen durch Versetzen mit 5 mL Natronlauge (10 mol/L) bzw. 5 mL Salzsäure (6 mol/L) auf den gleichen pH-Wert eingestellt und, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, extrahiert. Die Proben wurden gemeinsam derivatisiert und anschließend mit einer 65 μ m PDMS/DVB-Faser bei 60°C 25 min aus dem Headspace extrahiert. Die Derivate wurden mit GC-AED bestimmt und die auftretenden Peaks anhand eines Standards (vgl. Kap. 7.3.1) über die Retentionszeiten identifiziert.

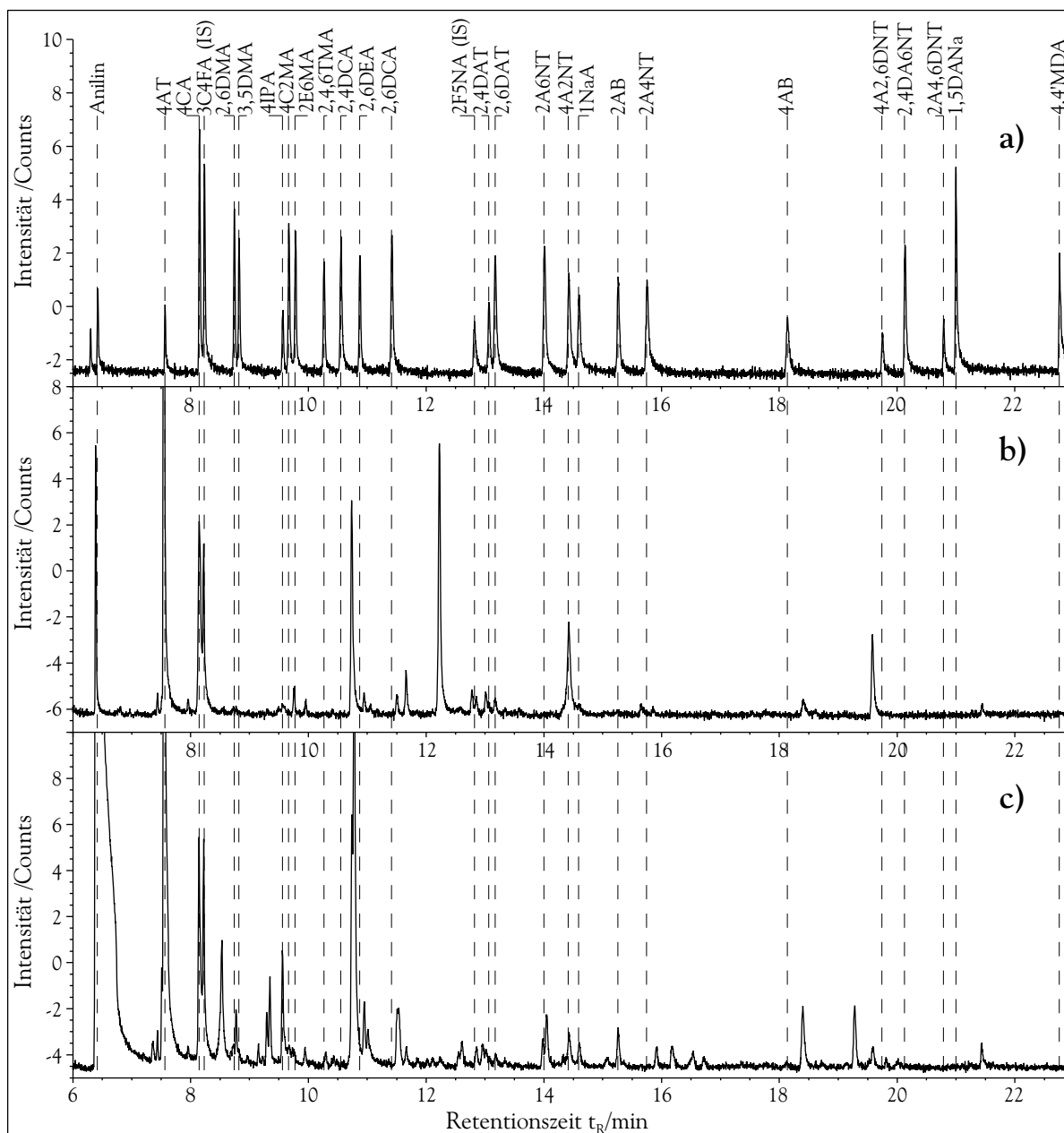


Abbildung 38: Vergleich einer Urinprobe nach b) basischer und c) saurer Hydrolyse mit a) einem Standard. Die Probe wurde bei der Entnahme mit $50 \mu\text{g}$ 4AT sowie 5 mL HCl (6 mol/L) je 100 mL stabilisiert und jeweils 5 mL 12 h bei 110°C sauer bzw. basisch hydrolysiert. Nach Derivatisierung erfolgte die 25minütige Extraktion aus dem Headspace bei 60°C mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser. Dargestellt ist die Iod-Spur I183 des GC-AED.

In Abb. 38 sind die Chromatogramme für saure und basische Hydrolyse gegenübergestellt. Nach saurer Hydrolyse finden sich deutlich mehr Peaks als nach basischer Behandlung. Interessanterweise treten unter den gewählten Bedingungen lediglich nach saurer Hydrolyse Peaks von 1NaA und 2AB deutlich hervor. In Hinblick auf eine Anwendung als Screening-Verfahren wurde deshalb die saure Hydrolyse weiter verfolgt.

Die Unterschiede zwischen saurer und basischer Hydrolyse deuten darauf hin, dass die Bindungsverhältnisse komplexer sind, als in Kap. 2 dargestellt. So sollte die Hydrolyse acylierter Verbindungen, die als Hauptausscheidungsprodukte gelten, unter den gewählten Bedingungen gleichermaßen sauer wie basisch erfolgen. Darüber hinaus laufen bei der Hydrolyse mehr Reaktionen ab, als bislang bekannt. So berichteten bereits SKARPING *et al.* von einem Rückgang der frei gesetzten Amine bei zu langer Hydrolyse [23].

Dies wurde auch bei einer dotierten Urinprobe sowie beim Vergleich eines Standards mit und ohne Hydrolyse beobachtet. Dazu wurden 20 mL einer Urinprobe sowie 20 mL Wasser mit jeweils 100 µL eines Standards versehen, der die Analyten in einer Konzentration von 250 µg/L enthielt. Die Proben wurden mit 10 mL konz. Salzsäure angesäuert, 12 h bei 110°C hydrolysiert und anschließend extrahiert. Verglichen wurden die Proben mit einem Standard, der die gleiche Menge an aromatischen Aminen enthielt, aber nicht hydrolysiert und ausgeschüttelt wurde. Die drei Proben wurden zusammen derivatisiert und mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser bei 60°C 25 min aus dem Headspace extrahiert. Die Derivate wurden mit GC-AED über die Iod-Spur I183 bestimmt.

Die Chromatogramme der Proben mit Hydrolyse sind in Abb. 39 gegenüber dem Standard 3fach vergrößert dargestellt. Verglichen mit dem Standard ohne Hydrolyse sind die Peaks im Chromatogramm der Urinprobe deutlich kleiner. Die Unterschiede sind derart ausgeprägt, dass sie nicht mit einer unvollständigen Extraktion erklärt werden können (vgl. Tab. 27 auf Seite 139). Da infolge der Hydrolyse gleichzeitig auch Amine freigesetzt werden, ist nur eine qualitative Beschreibung möglich.

Die Beobachtungen lassen sich nicht auf Reaktionen mit Matrixbestandteilen des Urins zurückführen, da bei dem Standard, der gleichermaßen hydrolysiert wurde, der Rückgang ebenfalls zu beobachten ist (vgl. Abb. 39b). Zudem konnten in der Kohlenstoff-Spur C193 keine Peaks ausgemacht werden, die als mögliche Reaktions-

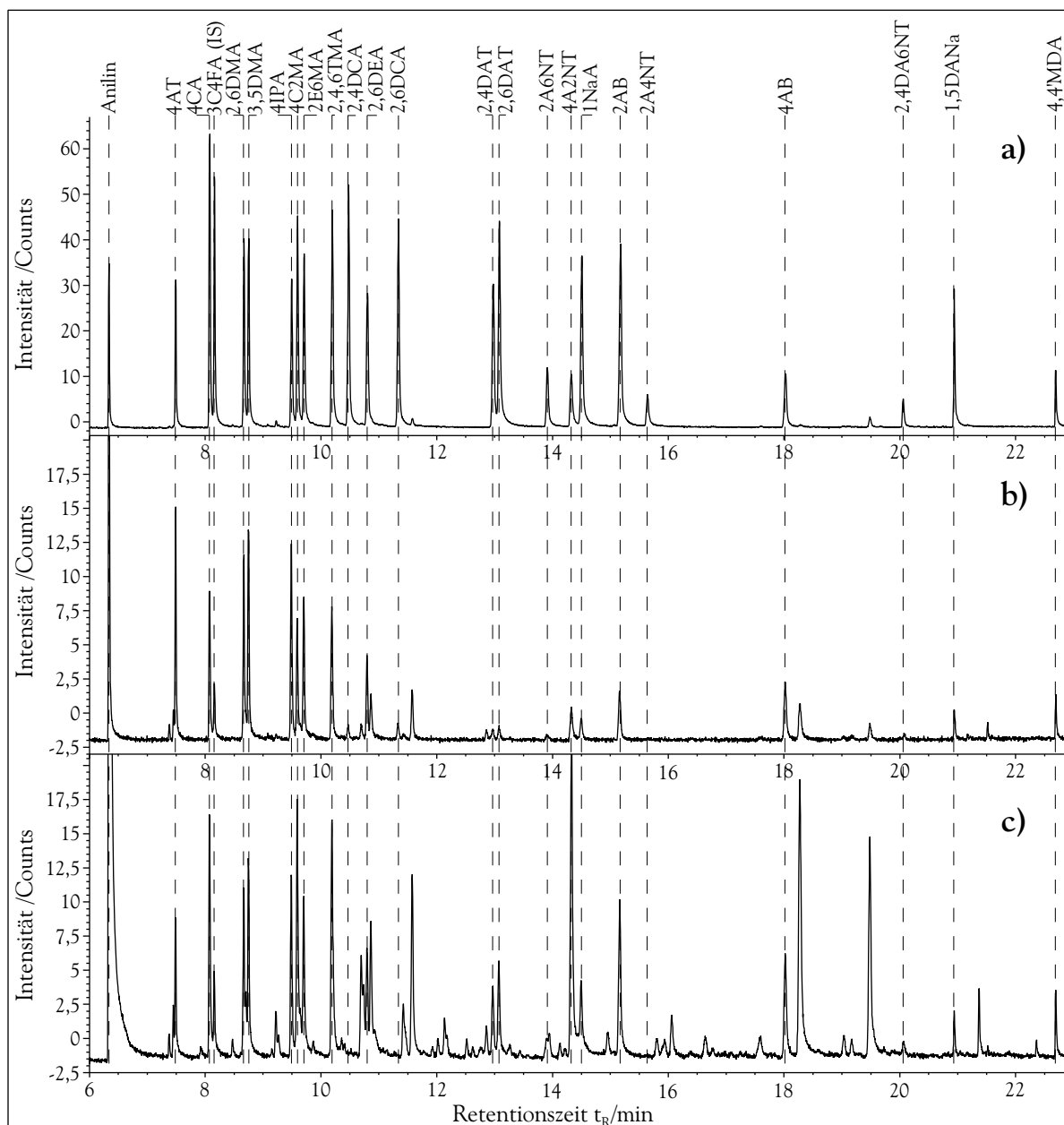


Abbildung 39: Vergleich b) eines Standards und c) einer Urinprobe nach Hydrolyse und Ausschütteln mit a) einem Standard ohne Behandlung. Die anfangs zugesetzte Menge an aromatischen Aminen ist in allen drei Fällen gleich. Im Anschluss wurden die Proben derivatisiert und mit einer $65\mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser 25 min bei 60°C aus dem Headspace extrahiert. Dargestellt ist die Iod-Spur des GC-AED, wobei b) und c) gegenüber a) dreifach vergrößert sind.

produkte in Frage kämen. Ein derartiges Verhalten ist äußerst ungewöhnlich und zum jetzigen Stand nicht mit gängigen Lehrbuch-Reaktionen in Einklang zu bringen. Die Amine, deren Reaktionen zumeist vom nucleophilen Stickstoff ausgehen, verlieren unter den sauren Bedingungen mit der Protonierung weitgehend ihre Reaktivität. Ebenso scheidet in Anbetracht der geringen Amin-Konzentration die Bildung von schwerlöslichen Hydrochloriden während der Hydrolyse aus. Die Bedingungen sind für einen qualitativen Nachweis geeignet, für weiterführende Arbeiten bedarf es aber einer systematischen Untersuchung der Hydrolyse.

7.3.5.3 Ausschütteln

Die Urinproben werden nach der Hydrolyse ausgeschüttelt, um die Zahl der auftretenden Matrix-Verbindungen zu verringern. Diese erschweren einerseits die Identifizierung und können sich darüber hinaus bei der Derivatisierung negativ bemerkbar machen.

Um dies zu verdeutlichen wurden 20 mL einer Urinprobe, wie in Kapitel 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert. 5 mL der insgesamt 30 mL wurden abgetrennt, während der Rest nach Einstellen des pH-Werts und Filtration mit Diethylether extrahiert wurde. Nach Rückextraktion in 5 mL Wasser wurde die Probe und die verbliebenen 5 mL der Urinprobe derivatisiert. Diese wurden zuvor lediglich neutralisiert und filtriert. Beide Proben wurden bei 60°C 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert. Die Derivate wurden mit GC-AED/MS bestimmt (vgl. Tab. 28).

Abb. 40 zeigt die Chromatogramme der Iod-Spur I183 a) ohne und b) mit Extraktion. Als wesentlichster Unterschied treten ohne Ausschütteln mehrere sehr große Peaks bei 12,125 min, 14,252 min, 19,007 min und 21,508 min auf, die beim Ausschütteln verloren gehen. Ansonsten treten in beiden Fällen viele Peaks auf, wenn auch infolge der Extraktion in unterschiedlicher Größe. Infolge der Extraktion lassen sich die Intensitäten nur schwer vergleichen. Auffällig ist, dass ohne Extraktion einige Peaks ähnlich groß sind wie mit Extraktion, obwohl im letzteren Fall von 5x mehr Probe ausgegangen wurde. Dies deutet auf deutliche Verluste bei der Extraktion hin (vgl. Tab. 27 auf Seite 139).

Der entscheidende Unterschied zeigt sich beim Vergleich der Kohlenstoff-Spuren C193,

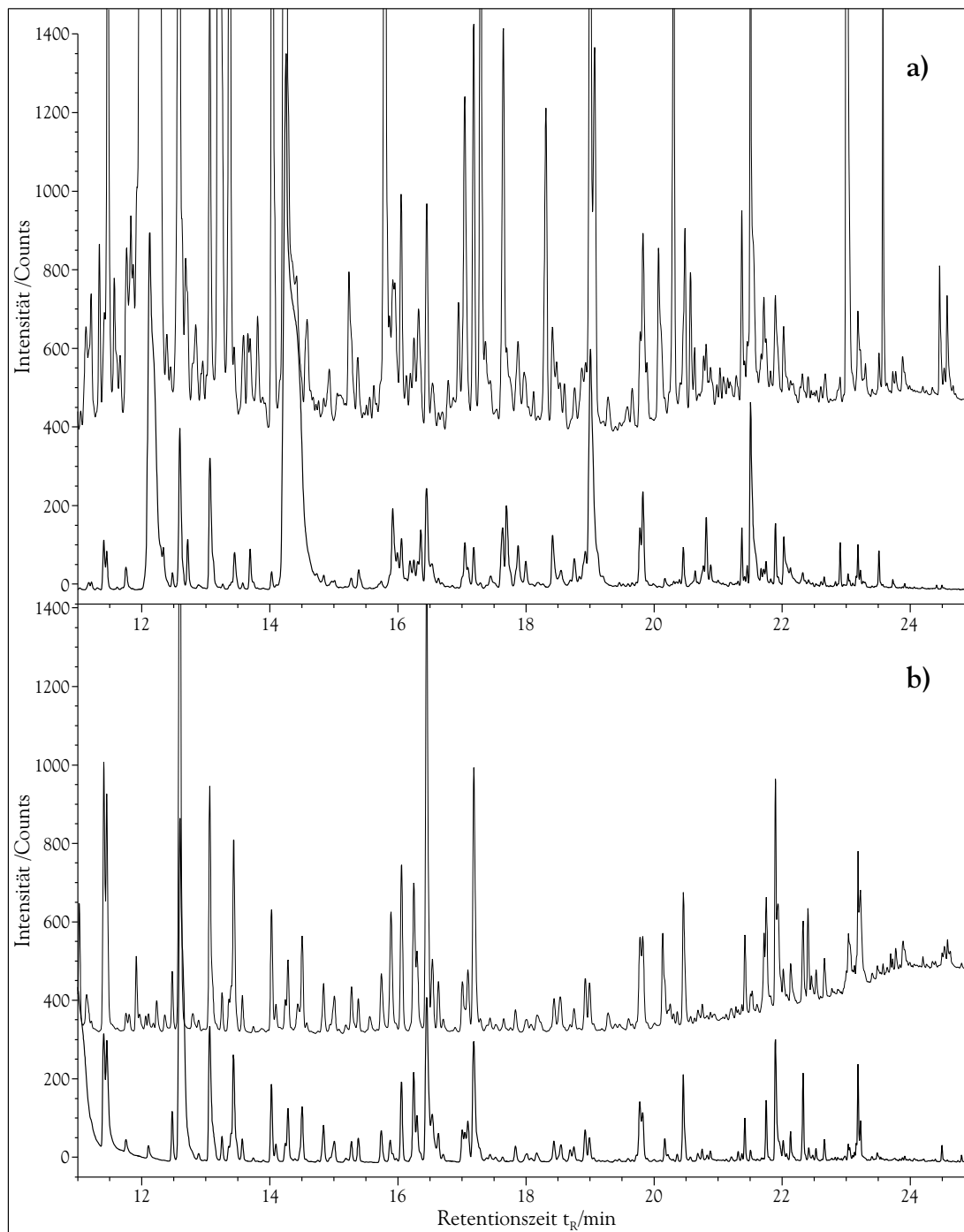


Abbildung 40: Bedeutung des Ausschüttelns. Anhand einer Urinprobe, die nach der Hydrolyse geteilt wurde, werden Chromatogramme der Iod-Spur I183 a) ohne und b) mit Ausschütteln verglichen. Die Proben wurden zuvor derivatisiert und mit SPME aus dem Headspace extrahiert. Dünn hinterlegt ist die Kohlenstoff-Spur C193 in 7facher Verkleinerung gezeigt. Die Chromatogramme wurden mit GC-AED/MS aufgezeichnet (vgl. Tab. 28 auf Seite 149).

die in Abb. 40 dünn hinterlegt sind: Trotz Extraktion aus dem Headspace treten ohne Ausschütteln erheblich mehr Matrixbestandteile auf. Während bei der extrahierten Probe leicht jedem Iod-Peak das entsprechende Kohlenstoff-Signal zugeordnet werden kann, ist dies ohne Extraktion deutlich schwerer. Dies gilt gleichermaßen für die massenspektrometrische Detektion und erschwert die Identifizierung unbekannter Verbindungen.

Insgesamt ist die Extraktion der Amine weitaus problematischer und arbeitsaufwendiger als die der Derivate. Andererseits trägt die Flüssig-flüssig-Extraktion maßgeblich dazu bei, Matrixbestandteile abzutrennen und damit die Identifizierung zu erleichtern.

Zur Überprüfung der Flüssig-flüssig-Extraktion wurden die Wiederfindungsraten der aromatischen Amine bestimmt. Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden die Proben zuvor nicht hydrolysiert. Die 7 Wasserproben und 8 Urinproben mit einem Probenvolumen von jeweils 5 mL wurden einheitlich mit einem Standard versehen. Den Proben wurden über einen Standard 12,5 ng jedes Amins zugesetzt. Zusätzlich wurden zwei Blindproben untersucht, bei denen der Urin nicht dotiert wurde. Nach Zugabe von 100 µL Natronlauge (10 mol/L) wurden die Proben mit 5 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde nach der Phasentrennung abgenommen und in 17 mL Vials mit 5 mL Wasser versetzt, das mit 200 µL konz. Schwefelsäure angesäuert wurde. Nach dem Ausschütteln wurde die organische Phase verworfen und Lösungsmittelreste 5 min bei 60°C im Stickstoff-Strom entfernt. Die Proben wurden, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, derivatisiert und bei 60°C mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser 25 min aus dem Headspace extrahiert. Anschließend wurden die Derivate mit GC-AED über die Iod-Spur I183 bestimmt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden zusätzlich 8 Wasserproben untersucht, die abgesehen von der LLE in gleicher Weise vorbereitet wurden.

In Tab. 27 sind die Wiederfindungsraten als Mittelwerte der 7 bzw. 8 Proben mit den zugehörigen Relativen Standardabweichungen für Wasser und Urin zusammengefasst. Da in der Urinprobe auch ohne Hydrolyse 4AT, 4C2MA und 2AB nachgewiesen werden konnten, wurden die Wiederfindungsraten anhand der Blindproben entsprechend korrigiert. Die Wiederfindungsraten betragen in Wasser durchschnittlich 53,3 % und in Urin 59,2 %. Die Werte für 2,4DA6NT wurden dabei nicht berücksichtigt, da hier vermutlich Koelution mit einem Matrixbestandteil die Ergebnisse verfälscht. Auch bei den Relati-

Tabelle 27: Wiederfindungsraten und Relative Standardabweichungen nach einmaliger LLE mit Diethylether. Nach Rückextraktion in die wässrige Phase wurden die Analyten derivatisiert und mit HS-SPME-GC-AED bestimmt.

Analyt	pK _s		log K _{OW} ^b	Wasser ^c		Urin ^d	
	calc. ^a	exp.		Rec.	(RSD) /%	Rec.	(RSD) /%
Anilin	4,61 ± 0,2	4,61 ^e	0,92	18,4	(19,5)	31,8	(16,7)
4AT	5,04 ± 0,2	5,15 ^e	1,41	27,3	(11,9)	43,2	(17,0)
2,6DMA	4,31 ± 0,2	3,89 ^e	1,81	42,6	(12,7)	49,7	(3,2)
3,5DMA	4,84 ± 0,2	4,91 ^e	1,91	49,6	(10,7)	51,2	(4,8)
2,4,6TMA	4,74 ± 0,2		2,31	43,6	(16,7)	46,3	(7,4)
4IPA	5,01 ± 0,2	4,85 ^f	2,34	43,0	(17,4)	53,7	(5,5)
2E6MA	4,22 ± 0,2		2,34	50,6	(15,1)	61,9	(4,3)
2,6DEA	4,13 ± 0,2		2,87	61,4	(16,0)	78,2	(5,6)
4CA	3,97 ± 0,2	4,05 ^e	1,91	67,5	(24,4)	73,4	(9,1)
4C2MA	3,81 ± 0,2	3,75 ^e	2,36	41,9	(11,3)	46,0	(6,3)
2,4DCA	2,02 ± 0,2	2,00 ^e	2,72	6,2	(8,1)	6,3	(10,2)
2,6DCA	0,71 ± 0,2	0,42 ^f	2,72	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)
2A4NT	2,34 ± 0,2	2,35 ^f	1,71	83,6	(9,0)	72,6	(2,0)
2A6NT	2,31 ± 0,2		1,63	81,9	(5,1)	69,9	(5,2)
4A2NT	2,96 ± 0,2	2,96 ^e	1,68	61,3	(13,7)	51,7	(13,0)
1NaA	3,94 ± 0,2	3,96 ^e	2,09	85,6	(5,8)	88,7	(3,8)
2AB	3,81 ± 0,2	3,85 ^e	2,80	78,1	(4,1)	69,4	(4,9)
4AB	4,26 ± 0,2	4,38 ^e	2,80	112	(4,6)	109	(3,8)
2,4DAT	5,12 ± 0,2		0,14	35,9	(16,9)	68,2	(7,9)
2,6DAT	4,74 ± 0,2		0,09	22,8	(16,4)	37,1	(6,2)
2,4DA6NT	3,32 ± 0,2		0,58	155	(6,1)	257	(19,3)
1,5DANa	4,53 ± 0,2	4,44 ^f	0,86	95,0	(6,7)	120	(3,3)
4,4'MDA	5,32 ± 0,2		1,76	62,5	(15,5)	75,2	(3,5)

^a berechnet mit ACD/Labs Version 4.67 bzw. ^b clogP von Daylight Chemical Information Systems (<http://www.daylight.com>), ^c n = 7, ^d n = 8, ^e Ref. [318], ^f Ref. [319].

ven Standardabweichungen wurden mit durchschnittlich 7,4 % bei Urin verglichen mit 12,2 % bessere Werte erzielt. Diese lassen sich vermutlich auf den durch Matrixbestandteile hervorgerufenen Aussalzeffekt zurückführen, der zu besseren und gleichmäßigeren Ergebnissen führt.

Zur Beurteilung der Wiederfindungsraten sind in Tab. 27 zusätzlich die $\log K_{OW}$ -Werte als Maß für die Polarität sowie die Säurekonstanten als pK_s -Werte der Aniliniumionen angegeben. Die Wiederfindungsraten nehmen mit zunehmenden $\log K_{OW}$ -Werten zu, wie anhand der alkylierten aromatischen Amine Anilin, 4AT, 2,6DMA, 3,5DMA, 2,4,6TMA, 4IPA, 2E6MA und 2,6DEA zu erkennen ist. Die Polarität ist ein wichtiges Kriterium für die Extraktion in die Diethylether-Phase und erklärt die geringen Wiederfindungsraten der polarsten Verbindungen. Zur Verbesserung der Wiederfindungsraten der polaren Diamine wurde deshalb im weiteren 3x mit je 5 mL Diethylether extrahiert.

Umgekehrt zeigen die nitrosubstituierten Amine durchschnittlich höhere Wiederfindungsraten als die alkylierten und chlorierten Aniline. Diese Resultate lassen sich mit den Säurekonstanten erklären: Wie Tab. 27 anhand der pK_s -Werte zeigt, liegen die Amine bei der basischen Extraktion vollständig ungeladen vor. Umgekehrt reicht bei der sauren Rückextraktion $pH=0$ nicht aus, um auch die aromatischen Amine mit geringer Basizität und dementsprechend kleineren pK_s -Werten wie 2,4- und 2,6DCA zurück in die wässrige Phase zu extrahieren. Aus diesem Grunde nehmen bei den chlorierten Analyten die Wiederfindungsraten ab. Da hierfür ein verglichen mit dem pK_s -Wert um 2 Größenordnungen geringerer pH -Wert gewählt werden sollte, liegen diese Analyten nur teilweise protoniert vor und verbleiben beim Ausschütteln in der organischen Phase. Trotz vergleichbarer Basizität sind bei den Aminonitrotoluolen die Wiederfindungsraten deutlich besser. Da diese mit um eine Größenordnung geringeren K_{OW} -Werten wesentlich polarer sind als die halogenierten Verbindungen, lassen sie sich auch in der ungeladenen Form bereits in die wässrige Phase extrahieren. Durch stärkeres Ansäuern lässt sich die Extrahierbarkeit der wenig basischen Amine verbessern. Da der pH -Wert einen Einfluss auf die anschließende Derivatisierung hat (vgl. Kap. 7.1.3), und die gefundenen Wiederfindungsraten für ein qualitatives Screening genügen, wurde aber darauf verzichtet.

7.3.5.4 Extraktion der Derivate mit SPME

Wie die Ergebnisse in Kap. 7.3.3.7 gezeigt haben, lassen sich die Derivate sehr gut aus dem Headspace extrahieren. Um die SPME-Faser zu schonen, erfolgte bei der Untersuchung von Urinproben die Extraktion ebenfalls aus dem Headspace. Da hier möglicherweise auch Verbindungen auftreten, die nicht für die Headspace-Extraktion geeignet sind, wurden beide Extraktionstechniken verglichen.

Ausgehend von jeweils 20 mL Urin, der, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert und extrahiert wurde, wurden beide Proben in 17 mL Vials gleichermaßen derivatisiert.

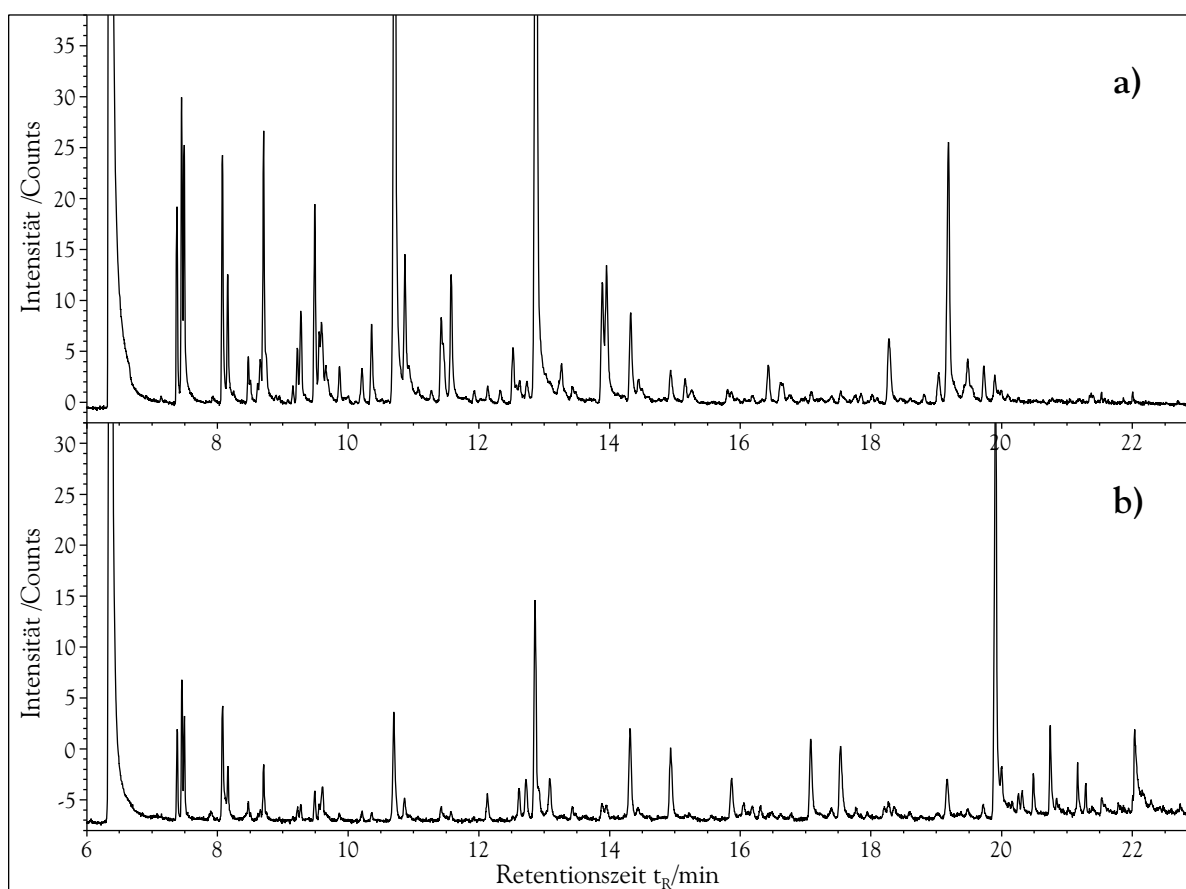


Abbildung 41: Vergleich von a) Headspace- und b) direkter Extraktion. Beide Male wurde von 20 mL Urin ausgegangen, der hydrolysiert, ausgeschüttelt sowie derivatisiert (vgl. Abb. 35 auf Seite 127) und für die direkte Extraktion zusätzlich mit 5 mL Wasser versehen wurde. Die Derivate wurden mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser 25 min bei Raumtemperatur direkt bzw. bei 60°C aus dem Headspace angereichert.

Erst danach wurde eine Probe mit weiteren 5 mL Wasser versehen, um für die direkte Extraktion die nötige Eintauchtiefe zu erreichen und den Headspace zu verringern. Beide Proben wurden 25 min bei Raumtemperatur direkt bzw. bei 60°C aus dem Headspace mit der gleichen 65 µm PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Derivate wurden mit GC-AED bestimmt.

In Abb. 41 sind die Iod-Spuren I183 beider Chromatogramme gezeigt. Die auftretenden Peaks stimmen in den meisten Fällen überein. Bei Extraktion aus dem Headspace wird wie in Kap. 7.3.3.7 eine deutlich bessere Empfindlichkeit erreicht. Dies gilt in besonderem Maße für die früh eluierenden Analyten. Lediglich unter den spät eluierenden Verbindungen sind einige, die bei Headspace-Extraktion nicht oder nur in geringem Maße auftreten. Wie bereits in Kap. 7.3.3.3 gezeigt, bedarf es für derartige Verbindungen höherer Extraktionstemperaturen. Da vergleichsweise wenige Verbindungen betroffen sind und die Vorteile überwiegen, wurde im folgenden an der Headspace-Extraktion festgehalten.

7.3.5.5 Bestimmung mit GC-AED

Für die Identifizierung aromatischer Amine nach Derivatisierung müssen besonders für komplexe Matrices mehrere Voraussetzungen erfüllt sein: Neben den bereits in Kap. 7.1.3 angesprochenen Aspekten hinsichtlich der Reaktivität in wässriger Lösung ist es erforderlich, dass die Reaktion selektiv verläuft. Nebenreaktionen, die ebenfalls zu iodierten Verbindungen führen, müssen zunächst ausfindig gemacht werden. Diese können vom Iodid ausgehen, das beispielsweise als Nucleophil in Substitutionsreaktionen auftreten kann. Darüber hinaus werden unter den gewählten Bedingungen auch aliphatische Amine diazotiert. Es ist zu klären, ob diese zu Iod-Verbindungen umgesetzt werden, die bei dem Verfahren stören. Weiterhin ist es grundsätzlich erforderlich, für die Umsetzung mit Iodid das Auftreten biogener Iod-Verbindungen zu untersuchen.

Iod gehört zu den essentiellen Elementen und tritt in Form des physiologisch wichtigen Schilddrüsenhormons Thyroxin auf. Iod-haltige Verbindungen werden als Röntgenkontrastmittel eingesetzt [320, 321]. Darüber hinaus sind nur wenige organische Iod-

Verbindungen bekannt, die in biologischem Material auftreten [322]. Weiterhin sind Störungen durch aliphatische Iod-Verbindungen denkbar, wie sie von SLAETS *et al.* im Meerwasser nachgewiesen wurden [304].

Zum Nachweis biogener Iod-Verbindungen wurden 60 mL Urin, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, sauer hydrolysiert. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 35 mL Natronlauge (10 mol/L) sowie 5 mL gesättigter Natriumacetat-Lösung auf pH 6 eingestellt. Nach der Filtration über Filterpapier wurden jeweils 10 mL Aliquote in 17 mL Vials gegeben. Die Proben wurden bei 60°C jeweils 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert und die angereicherten Verbindungen mit GC-AED bestimmt. Neben Iod über die Iod-Spur I183 wurden gleichzeitig C179 und S181 detektiert. Weitere Proben wurden für die Detektion von Cl479 und Br478 sowie O171 verwendet, die nicht simultan gemessen werden konnten.

Abb. 42 zeigt die jeweiligen Chromatogramme, wobei O171 um Faktor 10 und die Halogene um Faktor 25 vergrößert sind. Die Chromatogramme der Kohlenstoff- und der Sauerstoff-Spur in Abb. 42a) und b) verdeutlichen, dass trotz der Extraktion aus dem Headspace eine Vielzahl von Verbindungen auftreten. Auf diese Weise erscheint es ohne Derivatisierung unmöglich, aromatische Amine in Urin über Kohlenstoff, Wasserstoff oder Stickstoff selektiv neben der großen Zahl an Matrixkomponenten zu detektieren. Ebenso scheiden weitere der in Abb. 12 auf Seite 60 vorgestellten Derivate aus: Zwar können schwefelhaltige Verbindungen empfindlich detektiert werden, die große Zahl biogener Schwefel-Verbindungen macht jedoch ein Screening unmöglich. Ebenso lassen sich auch einige Halogen-Verbindungen nachweisen, deren Anzahl aber in der Reihe Cl–Br–I abnimmt. Da zudem die Iod-Spur I183 von den drei Halogenen als die empfindlichste gilt [323], bietet sich eine Derivatisierung, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, an.

Um Nebenprodukte der Umsetzung mit Iodid zu identifizieren, wurde die Derivatisierung ohne Nitrit durchgeführt. Dazu wurden 20 mL Urin, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert und extrahiert. Bis auf die Zugabe von Nitrit, wurde die Derivatisierung, wie in Kap. 7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde bei 60°C 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert und die iodhaltigen Verbindungen mit GC-AED bestimmt.

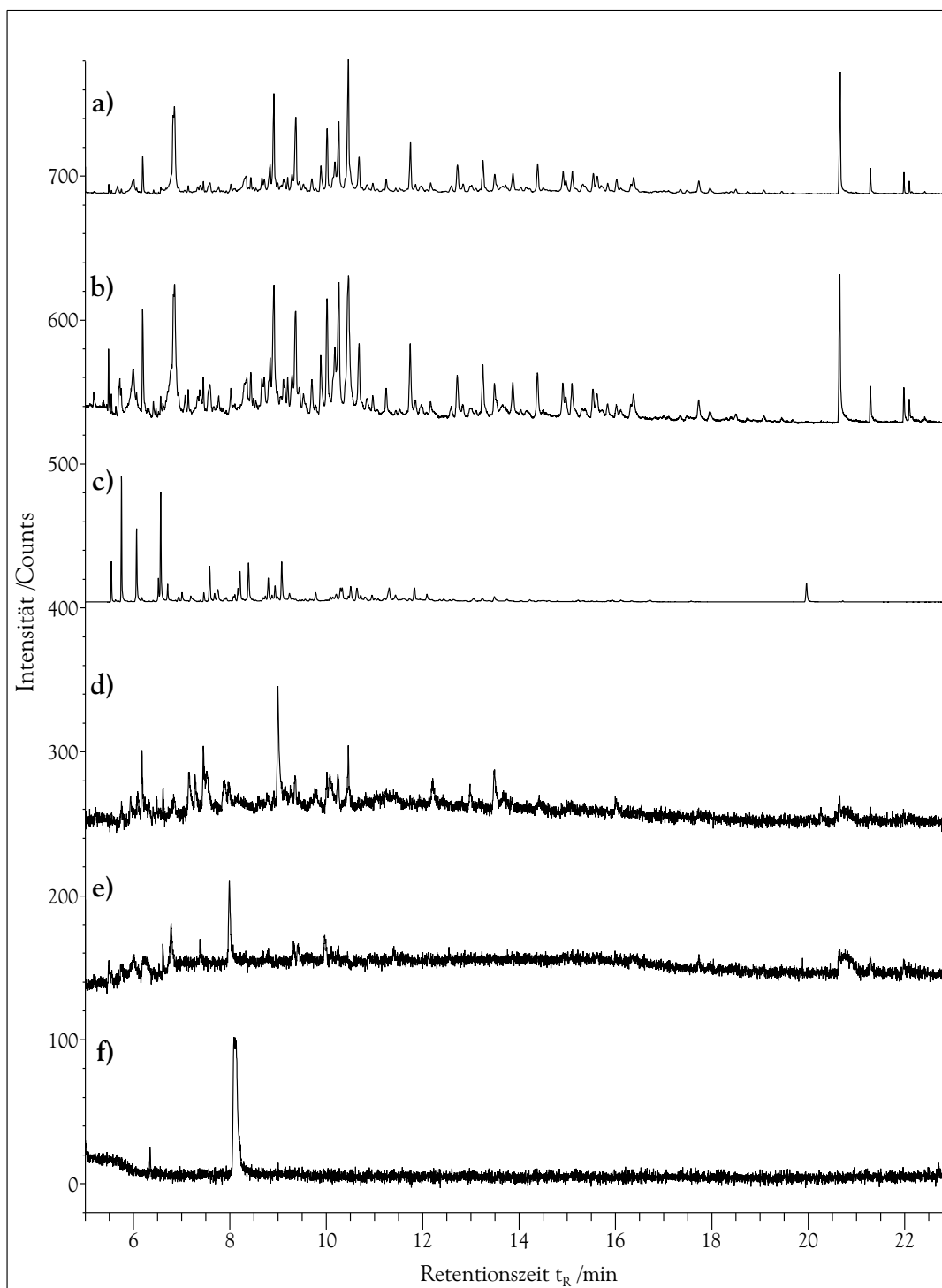


Abbildung 42: Chromatogramme einer Urinprobe ohne Derivatisierung. Nach saurer Hydrolyse wurde mit einer PDMS/DVB-Faser bei 60°C 25 min aus dem Headspace extrahiert. Die Detektion erfolgte mit GC-AED a) über C179, b) O171, c) S181, d) C1479 e) Br478, f) I183. Die Chromatogramme sind vertikal verschoben und b) um Faktor 10 sowie d), e), f) um Faktor 25 vergrößert.

Zum Vergleich wurden zwei Proben untersucht, die gleichermaßen hydrolysiert und ausgeschüttelt wurden, wobei im einen Fall die Derivatisierung wie üblich erfolgte (vgl. Abb. 43a), während bei der anderen auf diese verzichtet wurde (vgl. Abb. 43c). Ohne Nitrit (vgl. Abb. 43b) treten nur sehr wenige und zudem sehr kleine Peaks auf verglichen mit der derivatisierten Probe. Da einige der Verbindungen in der derivatisierten Probe in wesentlich größerer Menge auftreten, sind diese vermutlich verschleppt worden. Darüber hinaus gibt es keinerlei Anzeichen, dass durch das Iodid Nebenreaktionen auftreten, die das beschriebene Verfahren (vgl. Kap. 7.1.1 und 7.3.5) stören. Nebenreaktionen, die gleichermaßen diazotierte aliphatische Amine eingehen, lassen sich so allerdings nicht aufklären. Diese wurden mit GC-AED/MS näher untersucht (vgl. Kap. 7.3.5.6).

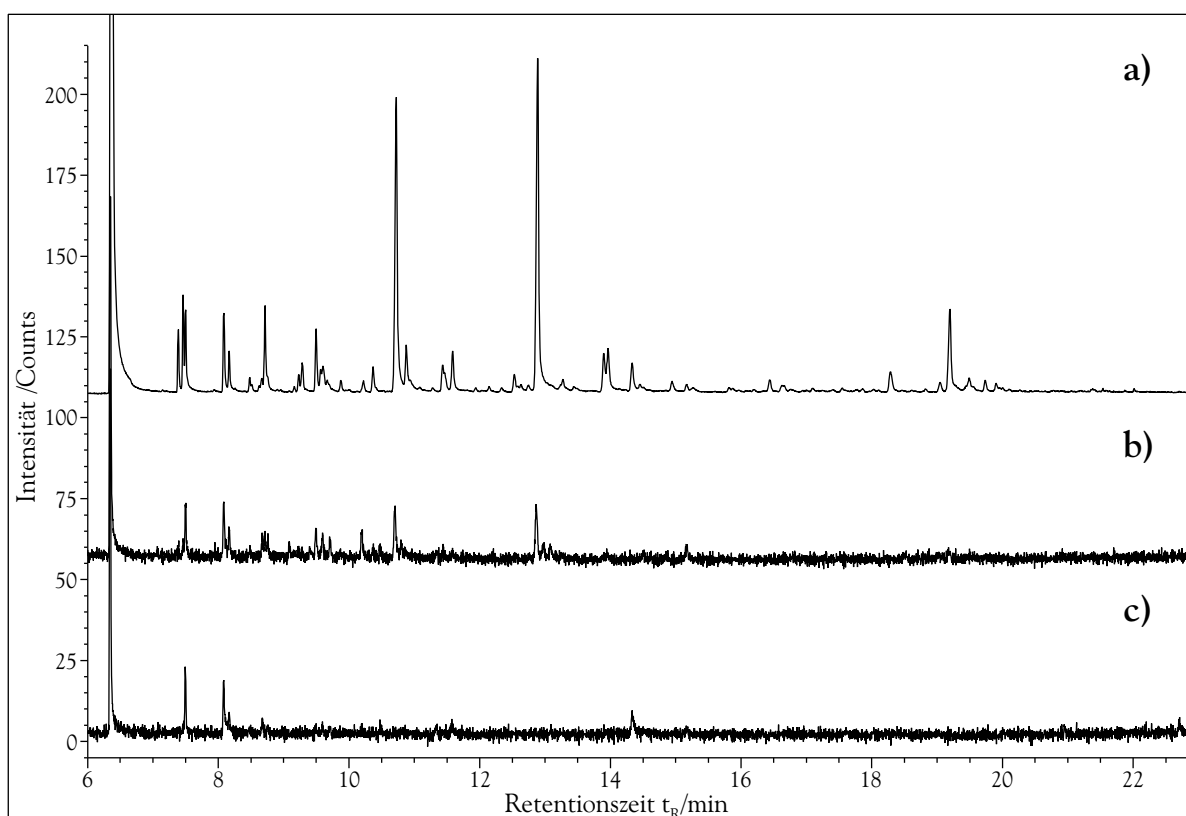


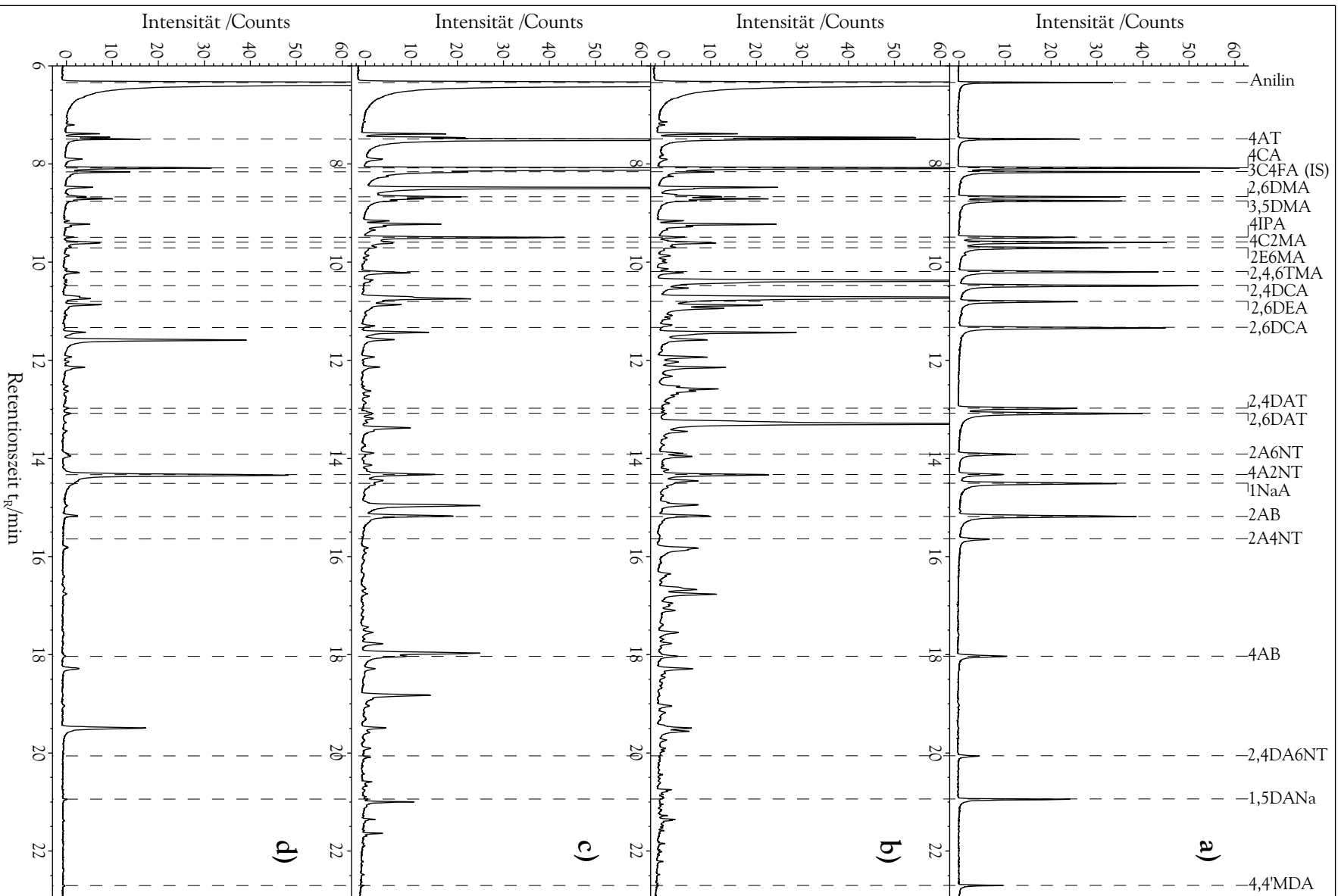
Abbildung 43: Störung der Derivatisierung durch Nebenreaktionen in Urin. Die Chromatogramme zeigen die Probe a) mit bzw. c) ohne Derivatisierung sowie b) ohne Zugabe von Nitrit. Die Proben wurden zuvor hydrolysiert und ausgeschüttelt. Die Bestimmung erfolgte mit GC-AED über die Iod-Spur I183 nach Extraktion mit Headspace-SPME. Die Chromatogramme b) und c) sind gegenüber a) um Faktor 50 vergrößert.

Zum Nachweis aromatischer Amine in Urin wurden die Proben wie in Kap. 7.3.5 beschrieben zunächst sauer hydrolysiert, ausgeschüttelt und derivatisiert. Anschließend wurden die Verbindungen bei 60°C 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert und mit GC-AED über die Iod-Spur I183 bestimmt.

In Abb. 44 werden so die Urinproben eines Rauchers, eines Nichtrauchers sowie eines Passivrauchers mit einem Standard verglichen. Bei dem Passivraucher handelt es sich um eine Person, die am Tag zuvor über mehrere Stunden Zigarettenrauch ausgesetzt war. Auf diese Weise lassen sich rasch Unterschiede hinsichtlich der individuellen Belastung mit aromatischen Aminen aufzeigen: Verglichen mit der Probe des Rauchers, treten beim Nichtraucher weit weniger aromatische Amine auf. Jedoch sind auch ohne konkrete Expositionsquelle wie Rauchen oder berufsbedingten Umgang mit Aminen, noch eine Vielzahl von Verbindungen nachweisbar. Die Ergebnisse stimmen darin mit den Beobachtungen von WEISS *et al.* überein, die im Urin der Allgemeinbevölkerung durchschnittlich (n= 200) 1,51 µg/L Anilin, 0,44 µg/L 2AT, 0,28 µg/L 3AT, 1,20 µg/L 4AT und 0,54 µg/L 3,5DCA bestimmten [60]. Ebenso wurden im Urin von Nichtrauchern von RIFFELMANN *et al.* Anilin, 4AT, 4C2MA und 2NaA nachgewiesen, jedoch war die Belastung der Raucher signifikant höher und umfasste ein breiteres Substanzspektrum [57]. Demgegenüber fanden GRIMMER *et al.* in allen Proben 1NaA, 2NaA, 2AB und 4AB, doch nur die Belastung mit 1NaA war bei Rauchern stark erhöht [40].

Verglichen damit ist die Zahl und die Konzentration aromatischer Amine in der Probe des Passivrauchers erheblich höher (vgl. Abb. 44). Die Ergebnisse unterscheiden sich kaum von denen des Rauchers. Die Unterschiede zwischen direkter Inhalation und der Aufnahme der Aniline aus der Umgebungsluft sind erstaunlich gering, bedenkt man die

Abbildung 44 (*gegenüberliegende Seite*): Vergleich verschiedener Urinproben mit GC-AED (vgl. Tab. 24 auf Seite 121). Die Chromatogramme der Iod-Spur I183 zeigen a) einen Standard ($\beta = 2,5 \mu\text{g/L}$ je Amin), b) die Urinprobe eines Rauchers, c) eines Passivrauchers und d) einer Person ohne bekannte Exposition. Die Proben für b) - d) wurden zuvor hydrolysiert, ausgeschüttelt, derivatisiert und mit Headspace-SPME extrahiert.



vergleichsweise geringe Flüchtigkeit der Verbindungen.

Eine gute Übereinstimmung der Retentionszeiten findet sich neben Anilin, 4AT und 4CA bei 2,6DMA, 3,5DMA, 4IPA, 4C2MA und 2E6MA, die in allen drei Proben in unterschiedlicher Menge auftreten (vgl. Abb. 44). Darüber hinaus konnten 2AB, 4AB, 1NaA sowie 2NaA nachgewiesen werden, das zwischen 4A2NT und 1NaA eluiert. Angesichts der großen Anzahl auftretender Verbindungen ist die Identifizierung anhand von Standard-Verbindungen schwierig. Im Gegensatz zu den Rüstungsalzlasten (vgl. Kap. 7.3.4) genügt hier die Retentionszeit nicht, um die Verbindungen eindeutig zu identifizieren. So ist zwar bei 4A2NT eine gute Übereinstimmung zu beobachten. Allerdings ist das Auftreten von 4A2NT angesichts der geringen Flüchtigkeit des Derivats und des Fehlens der anderen Aminonitrotoluole eher unwahrscheinlich. In einem weiteren Versuch mit einer anderen chromatographischen Säule konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um 4A2NT handelt (vgl. Kap. 7.3.5.6).

Verglichen mit der Zahl der Amine, die sich über die Retentionszeit identifizieren lassen, bleibt der überwiegende Teil der Verbindungen unbekannt. Auf diese Weise lässt sich nicht klären, ob die auftretenden Peaks auf aromatische Amine zurückgeführt werden können oder ob es sich um Artefakte der Derivatisierung handelt. Wie am Beispiel von 4A2NT gezeigt wurde, ist es darüber hinaus erforderlich, auch die identifizierten Verbindungen abzusichern. Aus diesem Grunde erfolgte die Detektion in den folgenden Kapiteln massenspektrometrisch.

7.3.5.6 Bestimmung mit GC-AED/MS

Die Identifizierung der auftretenden iodhaltigen Verbindungen wurde mit GC-AED/MS durchgeführt. Durch die parallele Detektion lassen sich die Selektivität des Atomemissionsdetektors mit dem hohen strukturellen Informationsgehalt des Massenspektrometers verbinden. Die exakte Zuordnung einer Struktur zu einem bestimmten Peak des anderen Detektors ist so einfach und zuverlässig.

Die Proben wurden dazu ausgehend von jeweils 20 mL Urin, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, mit 10 mL konz. Salzsäure 12 h bei 110°C hydrolysiert, anschließend aus-

Tabelle 28: Parameter zur Bestimmung aromatischer Amine mit GC-AED/MS

Gerät	GC-AED/MS mit Agilent GC 6890, AED 2350A, MSD 5973inert
Trennsäule	DB-5, 60 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Transfersäule	MSD: 1 m, 0,1 mm ID; AED: 6 m, 0,25 mm ID
Injektor	UNIS 2100 PTV-Injektor
Injektortemperatur	250°C isotherm
Split	nach 4 min Splitventil öffnen (69 mL/min)
GC-Programm	40°C für 3 min, mit 30°C/min auf 110°C heizen, mit 5°C/min auf 180°C heizen, mit 30°C/min auf 310°C heizen und 1,34 min halten (Gesamtdauer: 25 min)
Trägergas	Helium, 4 mL/min
Detektion AED	Elementspuren I183, C179, C193 Reaktandgase: O ₂ : 20 psi, H ₂ : 10 psi Cavity-, Transferline-Temperatur: 300°C, 280°C Helium Supply Pressure: 30 psi, Cavity Pressure: 1,5 psi Purge Vent: 35 mL/min, Cavity Vent: 60 mL/min
Detektion MSD	EI, 70 eV, Scanbereich: 30-550 u Multiplier-Spannung: 1200 V, Scan time: 0,60 s Ionenquelle, Transferline-Temperatur: 230°C, 260°C

geschüttelt und derivatisiert. Nach 25minütiger Extraktion aus dem Headspace mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser bei 60°C wurden die Derivate mit GC-AED/MS bestimmt (vgl. Tab. 28). Der Trägergasstrom wurde dazu nach der chromatographischen Säule mit einem Y-Stück geteilt. Über eine 1 m lange Transfersäule mit 0,1 mm ID wurde das Massenspektrometer gespeist und über eine 6 m lange Säule mit 0,25 mm ID wurde der andere Teil der eluierenden Verbindungen simultan zum AED geleitet. Die Längen und ID berücksichtigen dabei die unterschiedlichen Drücke in den beiden Detektoren.

Abb. 45 zeigt zwei auf diese Weise aufgenommene Chromatogramme. In Abb. 45a) ist die Iod-Spur I183 des AED dargestellt und in 45b) die entsprechende Massenspur 127 m/z des MSD. Die Retentionszeiten der Peaks sind beim massenspektrometrischen Detektor 0,125 min kürzer als beim AED, weshalb die Chromatogramme in Abb. 45 entsprechend verschoben wurden. Diese Abweichung ist auf die Einstellungen der Firma JAS zurückzuführen, die das Gerät zur Verfügung stellte. Das Verhältnis von 1 m MS-Transfersäule mit 0,1 mm ID zu 6 m AED-Transfersäule mit 0,25 mm ID wurde von ihnen gewählt, um ca. 80 % des Eluats zum AED zu leiten, führt aber gleichzeitig zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Abgesehen von dieser Korrektur stimmen die Peaks über das gesamte Chromatogramm sehr gut überein. Eine Verzerrung infolge des Temperaturprogramms ist nicht zu beobachten.

Wie Abb. 45 zeigt, lassen sich alle AED-Peaks zuordnen und mittels MS identifizieren. Die Zuordnung ist durch Vergleich des Iod-Signals I183 mit der entsprechenden Massenspur 127 m/z sehr einfach und bedarf nicht der jeweiligen Kohlenstoff-Spur bzw. des Totalionenstroms. Allerdings ist die Intensität der Peaks bei Verwendung der Massenspur 127 m/z häufig gering, da die Derivate unter den Bedingungen meist nur wenig fragmentieren und I^+ -Fragmente mit nur geringer Intensität auftreten (vgl. Kap. 7.1.7). Die Signalverhältnisse von AED und MS stimmen somit nur bedingt überein.

Während das AED-Signal unabhängig von der Verbindung proportional der aufgegebenen Stoffmenge ist, hängt das MS-Signal von der individuellen Ionisierung und Fragmentierung der Derivate ab. Hinzu kommt, dass die Massenspur 127 m/z nicht iodspezifisch ist: So hat das Derivat von Naphthylamin nach Abspaltung von Iod $[\text{M}-127]^+$ gleichfalls die Masse 127 und führt in Abb. 45b) zu einem überdurchschnittlich großen Signal bei

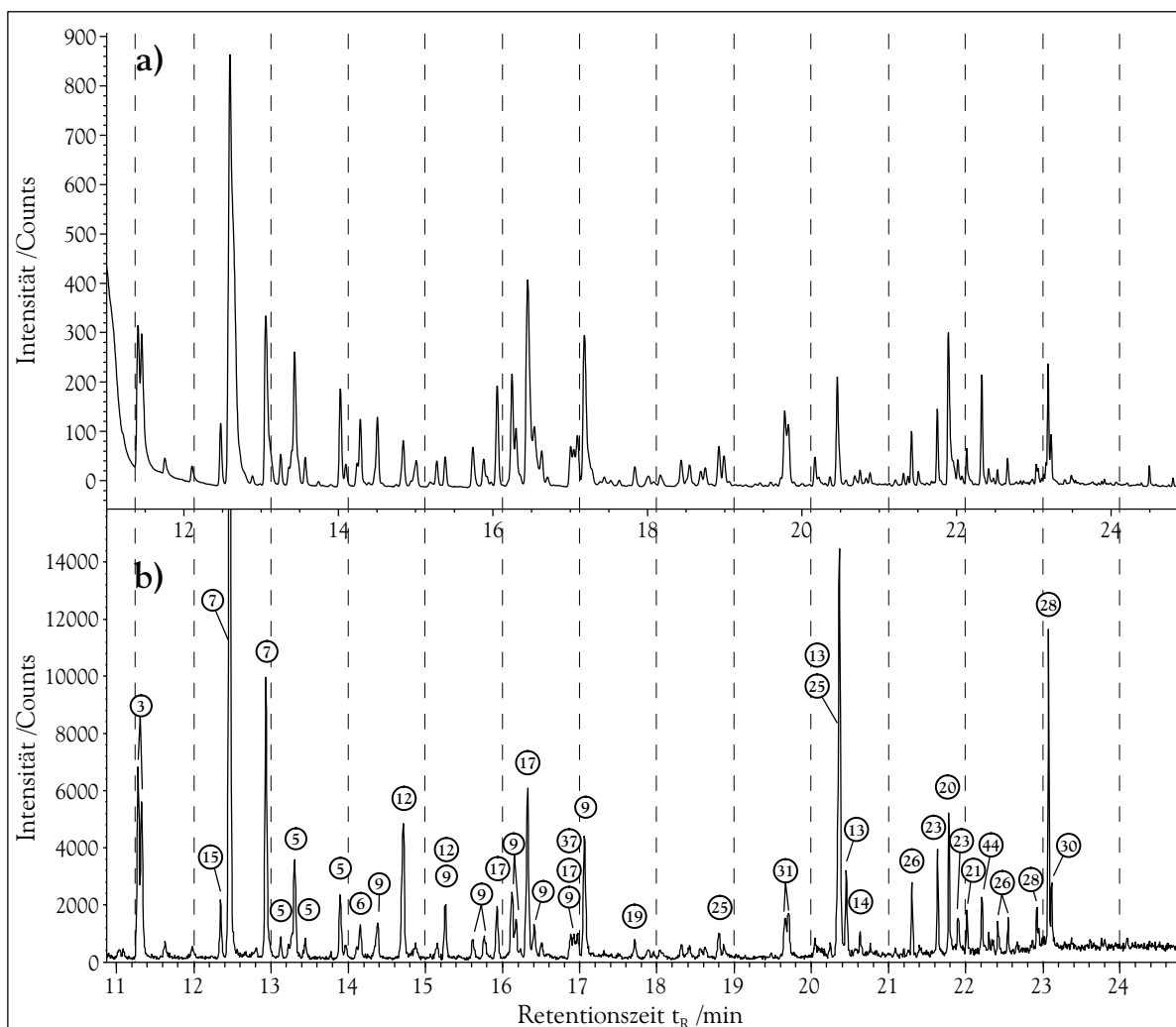


Abbildung 45: Vergleich von AED und MS anhand der Urinprobe eines Rauchers, die nach Hydrolyse, LLE und Derivatisierung mit einer $65\ \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser 25 min bei 60°C aus dem Headspace extrahiert wurde. Dargestellt sind a) die Iod-Spur I183 des AED und b) die Massenspur $127\ \text{m/z}$ des MS. Die Chromatogramme wurden simultan mit GC-AED/MS aufgezeichnet (vgl. Tab. 28). Das Chromatogramm in b) ist gegenüber a) um $+0,125\ \text{min}$ verschoben. Die Zahlen der identifizierten Verbindungen beziehen sich auf Tab. 30 auf Seite 158.

20,37 min. Abgesehen davon treten aber nur wenige Verbindungen auf, die ebenfalls ein Fragmentation der Masse 127 bilden und damit die Zuordnung erschweren.

Bei den iodhaltigen Verbindungen in Abb. 45 handelt es sich ausnahmslos um die Derivate aromatischer Amine, obwohl auch aliphatische Amine diazotiert werden. Im Gegensatz

zu den aromatischen sind sie nur in geringem Maße mesomeriestabilisiert. Angesichts der höheren Reaktivität reagieren sie rasch mit Wasser, das verglichen mit dem Iodid in etwa 350facher Konzentration vorliegt, so dass nur ein geringer Bruchteil zu aliphatischen Iod-Verbindungen führt.

Dagegen sind die Diazonium-Verbindungen von α -Aminosäuren und den davon abgeleiteten Peptiden über die Carbonylgruppe mesomeriestabilisiert. Sie ähneln in ihrer Reaktivität eher den aromatischen Diazonium-Verbindungen und reagieren selektiver mit Nucleophilen als die aliphatischen Diazonium-Ionen. Das Fehlen entsprechender iodierter Derivate kann abgesehen von der Umsetzung mit Wasser auf das Ausschütteln zurückgeführt werden, bei dem amphotere Verbindungen wie Aminosäuren abgetrennt werden. Zudem eignen sich mangels Flüchtigkeit selbst kleinste Peptide nach Derivatisierung weder für die Headspace-Extraktion noch für eine gaschromatographische Bestimmung und lassen sich so zurückhalten.

Bei sekundären aromatischen Aminen bleibt die Diazotierung auf der Stufe von Nitrosaminen stehen, tertiäre Amine werden unter den Bedingungen ($\text{pH} < 2$) nicht umgesetzt [279]. Das Verfahren ist somit für Urin geeignet. Eine Vielzahl primärer aromatischer Amine lässt sich außer in Wasser auch in Urin zu den aromatischen Iod-Verbindungen derivatisieren, ohne dass Störungen durch andere Aminoverbindungen oder Nebenreaktionen auftreten. Wie Abb. 45 zeigt, lassen sich so in einer komplexen Matrix wie Urin aromatische Amine nach Derivatisierung sehr selektiv über die Iod-Spur I183 bzw. die Massenspur 127 m/z nachweisen.

In Abb. 45b) sind die identifizierten Derivate aromatischer Amine für die intensivsten Peaks angegeben, wobei sich die Nummern auf die in Tab. 30 auf Seite 158 aufgeführten Verbindungen beziehen. Mit wenigen Ausnahmen stammen die intensivsten Peaks von alkylierten und chlorierten aromatischen Aminen. Daneben treten auch Aminobiphenyle und Naphthylamin deutlich hervor. Überraschend große Peaks liefern dazu noch die alkylierten Naphthylamine (20) und (28), von deren Existenz in Urin bislang noch nicht berichtet wurde.

Um die Dominanz alkylierter aromatischer Amine zu demonstrieren, wurde in Abb. 46a die Iod-Spur I183 den Massenspuren der Derivate 46b der Aminotoluole, 46c der

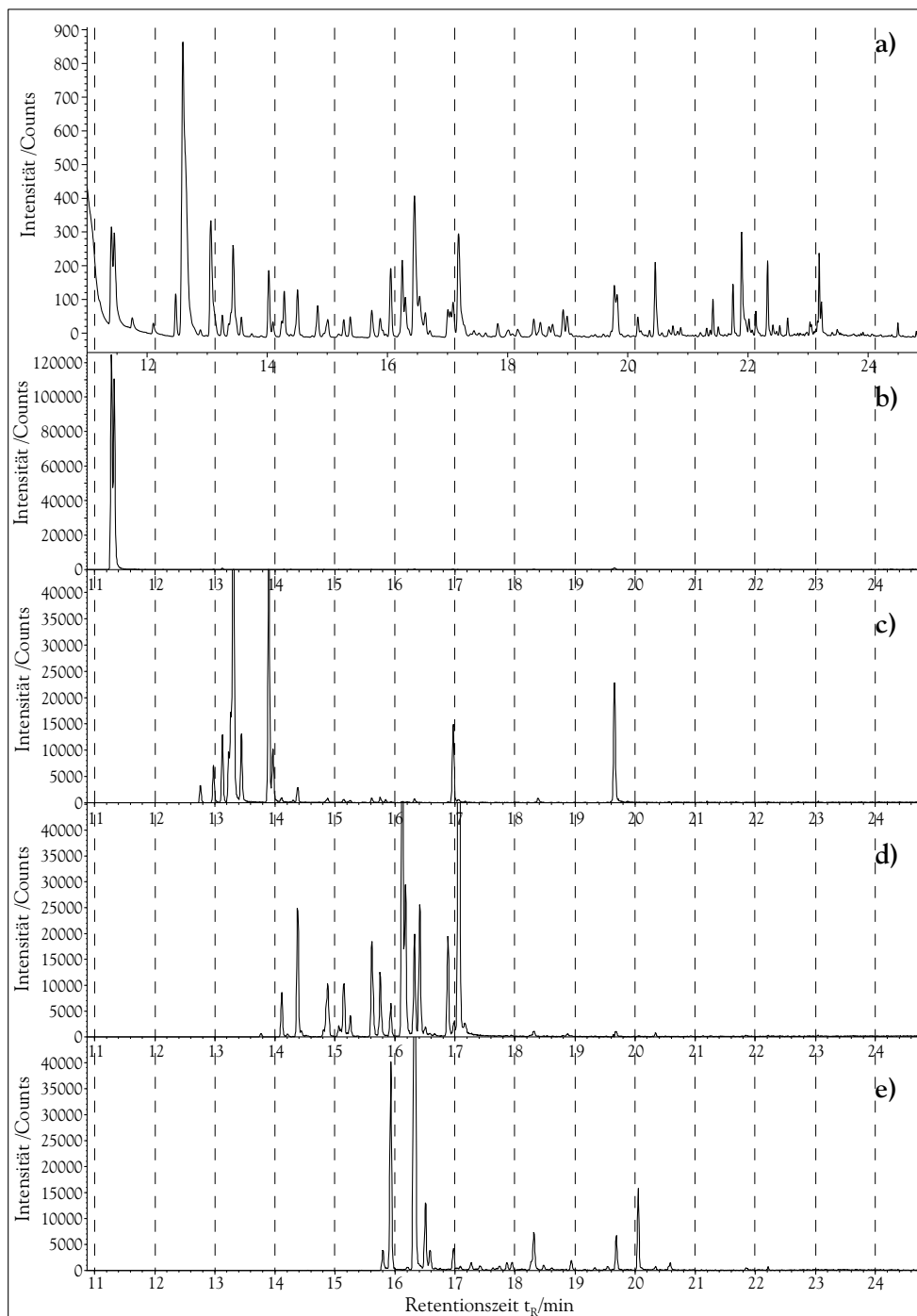


Abbildung 46: Identifizierung alkylierter aromatischer Amine in einer Urinprobe nach Hydrolyse, LLE, Derivatisierung und SPME aus dem Headspace. Dargestellt sind a) die Iod-Spur I183 bzw. die Massenspuren b) 218 m/z (AT), c) 232 m/z (C_2 -Anilin), d) 246 m/z (C_3 -Anilin) und e) 260 m/z (C_4 -Anilin). Die Chromatogramme wurden mit GC-AED/MS aufgezeichnet (vgl. Tab. 28). Die Chromatogramme in b) - e) sind gegenüber a) um +0,125 min verschoben.

C₂-Aniline, 46d der C₃-Aniline und 46e der C₄-Aniline gegenübergestellt. Beim Vergleich mit der Iod-Spur I183 wird deutlich, wie viele der Peaks auf alkylierte aromatische Amine zurückzuführen sind. Mit dem Grad der Alkylierung nimmt in der homologen Reihe die Zahl der Isomere und die Retentionszeit zu. Gleichzeitig nimmt deren Intensität in der Reihe ab. C₅-Aniline oder höhere wurden allenfalls in Spuren beobachtet. Interessanterweise treten trotz zunehmender Zahl von Isomeren für jedes Homologe jeweils zwei Peaks mit deutlich höherer Intensität hervor, obwohl alle einen intensiven Molpeak zeigen. Wie das Fehlen eines [M-15]⁺- bzw. [M-29]⁺-Peaks andeutet, sind diese bei den C₁ - C₃-Anilinen ausschließlich methylierte Isomere. Bei den C₄-Anilinen dagegen kann anhand des [M-15]⁺-Peaks in Verbindung mit dem Fehlen von [M-29]⁺- wie [M-43]⁺-Peaks auf Isomere geschlossen werden, die zumindest über einen Ethyl-Substituenten verfügen.

Da das Signal des AED von der jeweiligen Verbindung unabhängig und nur der aufgegebenen Stoffmenge proportional ist, können die Peaks unmittelbar verglichen werden. Eine Abschätzung der Konzentration in der Probe ist dennoch schwierig, da sowohl beim Ausschütteln wie bei SPME Unterschiede zwischen den Verbindungen auftreten. Unter Vernachlässigung dieser Aspekte enthalten die Proben neben Anilin große Mengen an Aminotoluolen und Chloranilinen, wohingegen bereits die C₂-Aniline in geringerer Konzentration auftreten (vgl. Abb. 45). Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von BRYANT *et al.* sowie FALTER *et al.* überein, die die Hämoglobin-Addukte von Ethyl- und Dimethylanilinen in wesentlich geringerem Maße fanden als die der Aminotoluole [56, 63].

7.3.5.7 Bestimmung mit GC-MS

Mit GC-AED/MS wurden den Iod-Signalen die entsprechenden Verbindungen zugeordnet. Dabei wurden bereits zahlreiche aromatische Amine identifiziert. Während das Interesse in Kap. 7.3.5.6 den intensivsten Iod-Signalen galt, soll in diesem Kapitel die Breite der auftretenden Verbindungen möglichst vollständig erfasst werden.

Die Urinproben wurden gleichermaßen, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, sauer hydrolysiert, ausgeschüttelt und derivatisiert, bevor sie bei 60°C 25 min mit einer 65 µm PDMS/DVB-

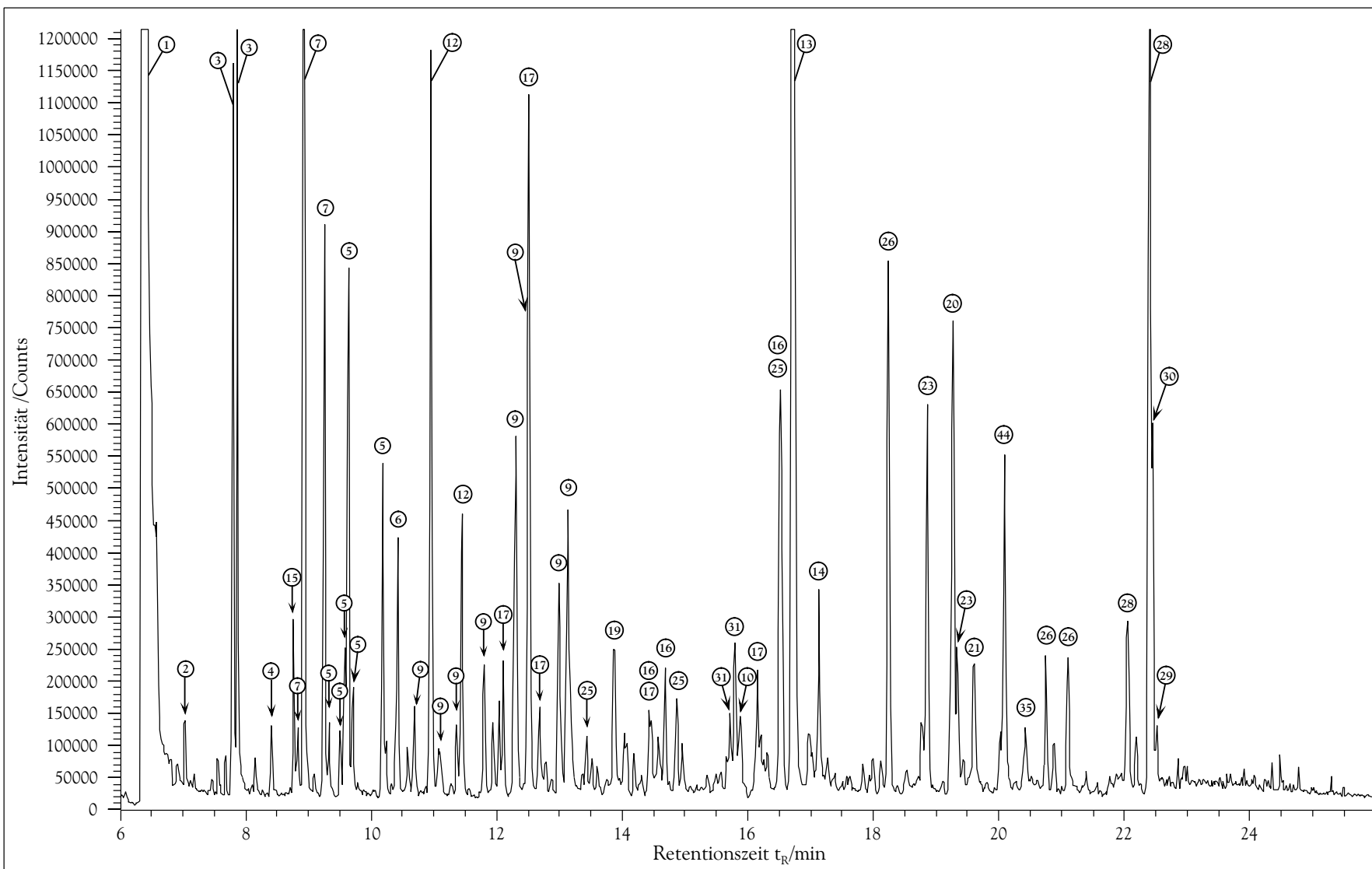
Tabelle 29: Parameter zur Bestimmung aromatischer Amine mit GC-MS

Gerät	Quadrupol-GC-MS Trace DSQ von Thermo Finnigan
Trennsäule	DB-5, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Injektor	PTV-Injektor, Siltek-Liner mit 2 mm ID
Injektortemperatur	250°C isotherm
Split	nach 4 min Splitventil öffnen (10 mL/min)
GC-Programm	40°C für 3 min, mit 30°C/min auf 100°C heizen, mit 5°C/min auf 180°C heizen, 1 min halten, mit 30°C/min auf 280°C heizen und 1 min halten (Gesamtdauer: 26,3 min)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
Detektion	EI, 70 eV, Scanbereich: 50-500 u Multiplifier-Spannung: 1000 V, Scan time: 0,92 s Transferline-, Ionenquellen-Temperatur: 250°C, 220°C

Faser aus dem Headspace extrahiert wurden. Die anschließende Bestimmung der Derivate erfolgte mit einem GC-MS mit Quadrupol-Massenspektrometer im fullscan-Modus (vgl. Tab. 29).

In Abb. 47 ist ein Chromatogramm der Massenspur 127 m/z gezeigt, in dem die zugeordneten Verbindungen für die intensivsten Peaks gezeigt sind. Im Anhang 12.3 sind zwei Ausschnitte des gleichen Chromatogramms aufgeführt, in denen alle verbleibenden Verbindungen zugeordnet sind. Die Nummern beziehen sich auf Tab. 30 auf Seite 158, in der die identifizierten aromatischen Amine nach zunehmender Molmasse geordnet sind.

Für die Zuordnung wurde von der Massenspur 127 ausgegangen, anhand derer die Derivate aromatischer Amine im Chromatogramm ausfindig gemacht wurden. Mit Hilfe der Molmassen der zugehörigen Verbindungen konnten häufig weitere Isomere ermittelt werden. Da für die meisten Derivate keine Einträge in der NIST Spektrenbibliothek verfügbar waren [324], wurden Strukturvorschläge ausgehend von ähnlichen Verbindungen entwickelt. Diese stützen sich neben der Molmasse der Derivate auf charakteristische



Fragmentationen und Isotopenmuster. Weil die Massenspektren der Isomere häufig sehr ähnlich waren, wurde die genaue Substitution nicht berücksichtigt (vgl. Tab. 30). So ließ sich im Detail nicht klären, ob beispielsweise ein C₃-Anilin dreifach methyliert war, einen Propyl-Substituenten trug oder mit Methyl- und Ethyl-Gruppen gemischt substituiert war. Zudem war auf diese Weise eine Unterscheidung von Positionsisomeren nicht möglich.

Die Massenspektren der beobachteten aromatischen Iodide haben einen intensiven Molekülionenpeak, der häufig identisch mit dem Basispeak ist. Neben dem charakteristischen Fragment 127 m/z lassen sich die Isomere aufgrund ihrer hohen Molekülmasse infolge der Iod-Substitution leicht entdecken. Besonders der Molekülionenpeak ist sehr hilfreich, da er wesentlich intensiver als das Fragmention 127 ist und außerhalb unspezifischer Fragmentationen liegt. Anhand der Fragmentierung des Rings mit den typischen Ionenserien 91 m/z, 77-79 m/z, 63-67 m/z, 50-52 m/z etc. kann zudem leicht auf den aromatischen Ursprung der Derivate geschlossen werden. Die Derivate zeigen in der Regel nur wenig Fragmentierung, die häufig von der Abspaltung von Iod ausgeht und zu einem typischen [M-127]⁺-Peak führt.

Zudem stützen die anderen Derivate die Strukturvorschläge: So treten heteroaromatische Amine stets kurz nach den entsprechenden homoaromatischen Kohlenstoff-Verbindungen auf. Dies zeigt sich beispielsweise bei den Derivaten von Anilin (**1**) und Aminopyridin (**2**) sowie Naphthylamin (**13**) und Aminochinolin (**14**). Für viele Verbindungen konnten Homologe identifiziert werden, deren Masse um $x \cdot (14 \text{ m/z})$ entsprechend (CH₂)_x verschoben ist. Beispiele hierfür sind Verbindungen, die von Anilin, Diaminobenzol, Aminobiphenyl und Naphthylamin ausgehen. Weiterhin sind die Strukturvorschläge mit der Zahl der möglichen Isomere vereinbar, die in den homologen Reihen zunimmt.

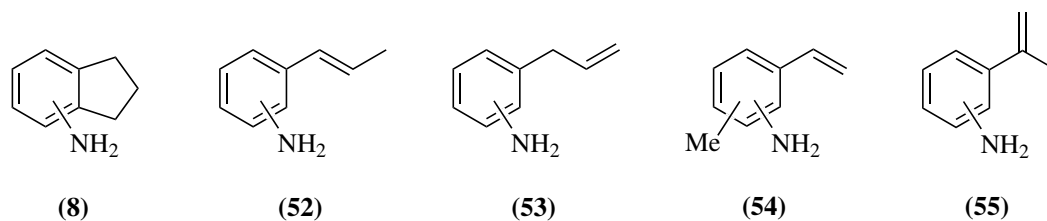
Abbildung 47 (*gegenüberliegende Seite*): Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers, die sauer hydrolysiert, ausgeschüttelt und derivatisiert wurde (vgl. Kap. 7.3.5). Die Derivate wurden bei 60°C 25 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert und mit GC-MS bestimmt (vgl. Tab. 29). Dargestellt ist die Massenspur 127 m/z. Die Nummern der Verbindungen beziehen sich auf Tab. 30 auf Seite 158.

Tabelle 30: Übersicht über die in Urin identifizierten Verbindungen zusammen mit den Molekülmassenzahlen MZ und den Retentionszeiten t_R der Derivate (vgl. Tab. 29).

Nr.	Substanz	MZ	Retentionszeiten der Isomere t_R /min
1	Anilin	204	6,35
2	Aminopyridin	205	7,03
3	Aminotoluol	218	7,80; 7,89
4	Aminophenol	220	8,41
5	C ₂ -Anilin	232	9,09; 9,33; 9,50; 9,58; 9,64; 9,72; 10,18
6	Anisidin	234	10,42; 10,52; 10,24
7	Chloranilin	238	8,83; 8,93; 9,26
8	Aminoindan	244	12,19; 12,42; 13,01; 13,51
9	C ₃ -Anilin	246	10,01; 10,39; 10,69; 11,08; 11,25; 11,36; 11,47; 11,81; 11,93; 12,28; 12,51; 12,99; 13,13
10	C ₃ -Aminopyridin	247	13,08; 15,89
11	Aminothioanisol	250	13,99; 14,28; 14,57
12	Chlormethylanilin	252	10,84; 10,96; 11,45; 11,55
13	Naphthylamin	254	16,71; 16,75
14	Aminochinolin	255	17,17
15	Chlorfluoranilin (IS)	256	8,76
16	Tetrahydronaphthylamin	258	14,40; 14,68; 14,77; 15,49; 16,20; 16,51
17	C ₄ -Anilin	260	11,95; 12,10; 12,38; 12,48; 12,68; 12,84; 12,90; 13,27; 13,36; 13,57; 13,71; 13,82; 13,96; 14,17; 14,30; 14,47; 14,51; 14,65; 14,96; 15,37; 15,43; 15,54; 15,83; 16,16; 16,57
18	C ₂ -Chloranilin	266	12,54; 13,21; 13,31; 13,47; 13,87; 13,91; 14,08; 14,45; 14,62
19	Chlormethoxyanilin	268	13,87; 14,07; 14,19
20	Methylnaphthylamin	268	18,94; 19,24; 19,54; 19,64; 19,72
21	Methylaminochinolin	269	19,60; 21,96
22	Dichloranilin	272	12,24; 12,31
23	Methyltetrahydro- naphthylamin	272	15,86; 16,25; 16,29; 16,54; 16,80; 16,95; 17,00; 17,09; 17,31; 17,57; 17,62; 17,85; 18,12; 18,71; 18,77; 18,86; 19,34; 19,43
24	C ₃ -Anisidin	276	14,94; 18,52

Übersicht über die in Urinproben identifizierten Verbindungen (Forts.).

Nr.	Substanz	MZ	Retentionszeiten der Isomere t_R /min
25	C ₃ -Chloranilin	280	13,42; 13,50; 14,74; 14,86; 15,30; 15,36; 16,54; 18,00; 19,09
26	Aminobiphenyl	280	18,25; 20,75; 21,09
27	Bromanilin	282	10,58; 10,65; 11,04
28	C ₂ -Naphthylamin	282	21,38; 21,87; 22,04; 22,18; 22,39
29	C ₂ -Aminochinolin	283	21,93; 22,52
30	C ₂ -Tetrahydro- naphthylamin	286	17,03; 17,37; 17,92; 18,28; 18,54; 18,64; 19,41; 19,64; 19,81; 20,13; 20,40; 20,52; 21,76; 22,09; 22,19; 22,44
31	C ₄ -Chloranilin	294	15,73; 15,79
32	Methylaminobiphenyl	294	20,57; 20,63; 21,24
33	Brommethylanilin	296	12,88
34	C ₃ -Naphthylamin	296	22,85; 23,38; 23,42; 23,45; 23,64; 23,68; 23,77; 23,90; 24,02
35	C ₃ -Tetrahydro- naphthylamin	300	20,01; 20,07; 20,43; 22,46; 22,59; 22,85; 22,95; 22,99; 23,25; 24,05
36	C ₂ -Aminobiphenyl	308	23,04; 23,90; 24,04
37	Diaminobenzol	330	13,10; 13,16; 13,60
38	Diaminotoluol	344	15,45; 15,57; 15,65; 15,76; 16,09; 14,66
39	C ₂ -Diaminobenzol	358	17,97; 18,17; 18,54
40	Chlordiaminobenzol	364	17,20; 17,26; 17,35
41	C ₃ -Diaminobenzol	372	17,85; 19,47; 21,55
42	C ₃ -Diaminopyridin	373	22,35
43	Diaminonaphthalin	380	24,07
44	C ₄ -Diaminobenzol	386	20,07; 20,50
45	Methyldiaminonaphthalin	394	24,77
46	Benzidin	406	24,36
47	Bromdiaminobenzol	408	18,63
48	C ₂ -Diaminonaphthalin	408	25,48
49	C ₂ -Diaminochinolin	409	25,28
50	Methyldianilin	420	24,47; 24,99; 25,59
51	Triaminotoluol	456	22,38



Während für die meisten Verbindungen auf diese Weise eine schlüssige Identifizierung möglich ist, ergeben sich für die Substanzen **(8)**, **(16)**, **(23)**, **(30)** und **(35)** mehrere Strukturisomere. Zudem ist die angegebene Struktur wie im Falle von Aminoindan **(8)** nicht immer mit der Zahl möglicher Positionsisomere vereinbar. Zwar sind vier isomere Amine denkbar, aber nur zwei aromatisch. Die Bildung der anderen beiden Isomere ist nicht mit den Erfahrungen der Derivatisierung vereinbar, die selektiv zur Bildung aromatischer Iodide führt. Bei vergleichbaren substituierten Indanen ist anders als bei den beobachteten Massenspektren der Molekülionenpeak wenig intensiv. Dies führt zu der Annahme, dass zumindest zwei Isomere auf Verbindungen mit anderem Grundgerüst entfallen. In Frage kommen hierfür die folgenden Verbindungen:

Abgesehen von α -Methylstyren **(55)** haben die entsprechenden reinen Kohlenwasserstoffe sehr ähnliche Massenspektren, während nur bei **(55)** die Abspaltung einer Methylgruppe und die Bildung eines $[M-15]^+$ -Fragments zu beobachten ist. Mangels dieses Fragments beschränkt sich die Auswahl auf die verbleibenden 4 Verbindungen, von denen das Methyl-Styren **(54)** ebenfalls nicht in Frage kommt, da das zugrunde liegende Styren ohne Methyl-Substitution selbst nicht auftritt. Deshalb ist davon auszugehen, dass sich die beobachteten 4 Verbindungen neben Aminoindan **(8)** auf die beiden isomeren Propenylaniline **(52)** und **(53)** verteilen.

Ähnlich verhält es sich bei den Tetrahydronaphthylaminen **(16)**, **(23)**, **(30)** und **(35)**, bei denen die große Zahl an Isomeren mit homologen Aminoindanen und Propenylanilinen erklärt werden kann. Schlussendlich sind dies jedoch nur Strukturvorschläge, die mit weiteren MS-Experimenten abgesichert werden müssen. Mit Hilfe hochauflösender Massenspektrometrie könnten so die Summenformel verifiziert und mit MS/MS-Experimenten wichtige Informationen zur Strukturisomerie erhalten werden.

Insgesamt wurden so über 200 Derivate aromatischer Amine im Urin von Rauchern iden-

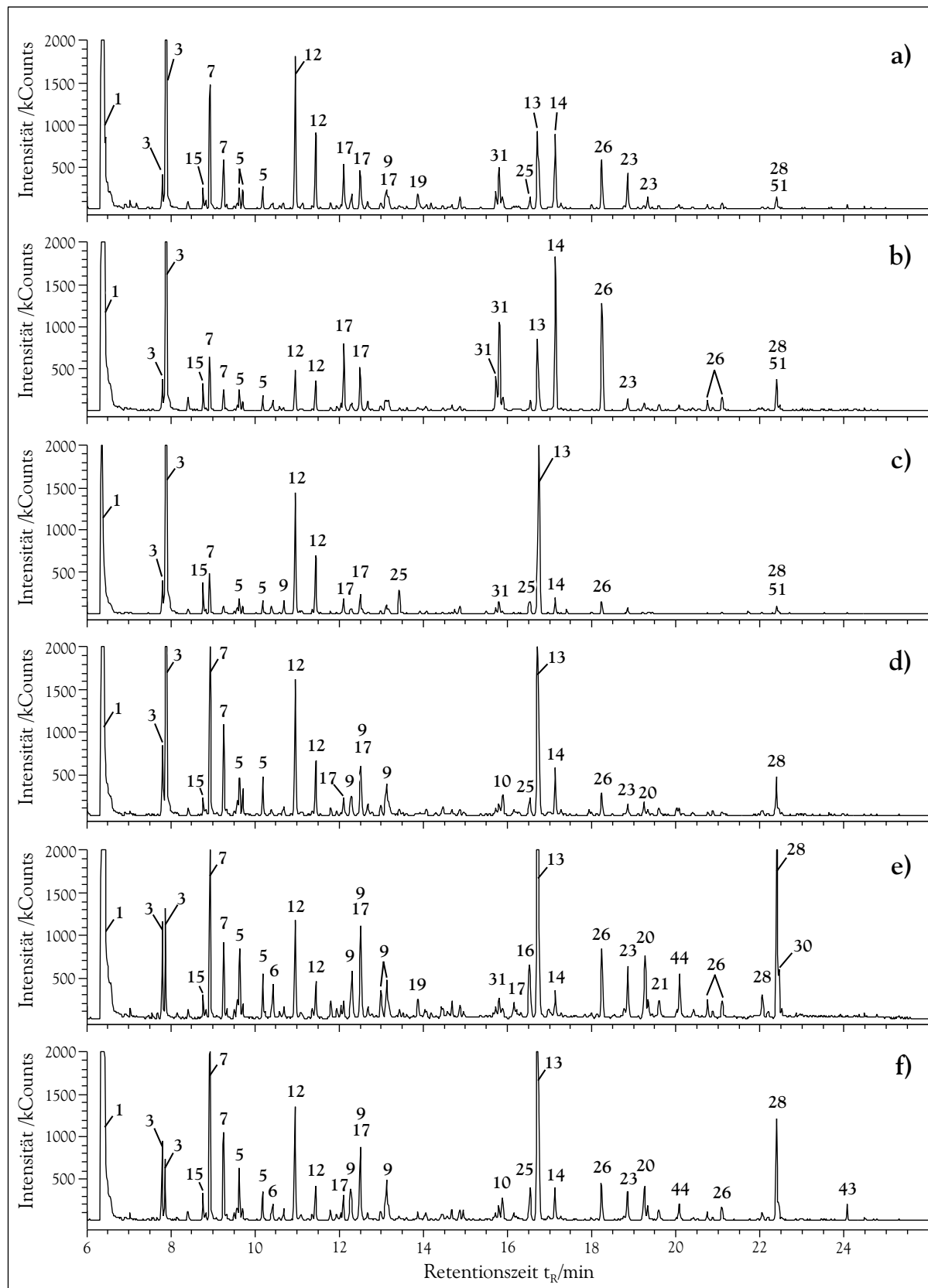
tifiziert (vgl. Tab. 30), die sich auf 50 Strukturen verteilen. Eine Vielzahl entfällt auf alkylierte aromatische Amine. Damit stimmen die Ergebnisse mit den Arbeiten von FALTER *et al.* sowie BRYANT *et al.* überein, die neben Aminotoluolen bereits die Ethyl- und Dimethylaniline als Hämoglobin-Addukte nachweisen konnten [56, 63]. Die mit dem neuen Verfahren nachgewiesenen Amine überschreiten die Zahl der bislang bekannten Verbindungen jedoch bei weitem. Es treten weitaus mehr Homologe auf als bislang bekannt. Erstmals konnten auch substituierte Aminobiphenyle und Naphthylamine nachgewiesen werden. Weiterhin wurden neben den bereits bekannten Diaminotoluolen [23–26, 57] auch höhere Homologe gefunden.

Verglichen mit zahlreichen Chloranilinen treten nur wenige Bromaniline auf. Dies deckt sich mit der unterschiedlichen Verbreitung von Chlor und Brom in der Umwelt und deren Bedeutung für den Menschen [44]. Darüber hinaus konnten einige heteroaromatische Amine nachgewiesen werden, die als Bindeglied zu den hoch toxischen heterocyclischen aromatischen Aminen angesehen werden können. Interessant ist auch das Auftreten von Triaminotoluol, während Triaminobenzol nicht nachgewiesen werden konnte. Die umgekehrten Verhältnisse findet man bei den analogen Diamino-Verbindungen: Hier dominieren Diaminobenzole, während die Diaminotoluole erheblich kleinere Peaks liefern.

Bis auf wenige Ausnahmen konnten allen Peaks der Massenspur 127 m/z aromatische Amine zugeordnet werden. Nur in einigen Fällen wie beim Biphenyl ($t_R = 12,02$ min) konnte die Fragmentation 127 m/z nicht auf Iod zurückgeführt werden. Störungen durch aliphatische Iodide wurden nicht beobachtet.

Um Unterschiede bei der Exposition der Testpersonen aufzuzeigen, wurden mehrere Proben verglichen. Die Proben wurden gleichermaßen hydrolysiert, ausgeschüttelt sowie derivatisiert und ebenfalls vor der Bestimmung mit GC-MS mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser 25 min bei 60°C extrahiert.

Abb. 48 zeigt die Chromatogramme der Urinproben von Passivrauchern und Rauchern. Bei allen Proben ist ein ähnliches Muster zu erkennen, bei dem stets die gleichen Verbindungen auftreten. Weiterhin sind auch die Intensitätsverhältnisse nur geringen Schwankungen unterworfen: Es dominieren überwiegend die gleichen Isomere, während andere stets nur in geringer Konzentration vertreten sind. Dies überrascht, bedenkt



man die starken Schwankungen, denen die Zusammensetzung des Urins unterworfen ist. So nannten GRIMMER *et al.* für die Bestimmung von 2AB, 4AB, 1NaA und 2NaA im Urin von Rauchern (n= 12), Nichtrauchern (n= 14) und Passivrauchern (n= 22) jeweils Relative Standardabweichungen von über 100 % [40]. Drastische Unterschiede scheinen auf wenige Analyten beschränkt zu sein: So ergeben C₂-Naphthylamin in Abb. 47e) und 47f) intensive Peaks, während sie in 47a)- d) kaum in Erscheinung treten. Demgegenüber sind die Unterschiede zwischen den Proben von Rauchern und Passivrauchern gering. Im wesentlichen beruhen sie auf einem bei Rauchern stark erhöhten Naphthylamin-Peak. Angesichts der starken Variabilität der Zusammensetzung bedarf es weiterer Proben, um die Unterschiede besser aufzeigen zu können.

Abbildung 48 (*gegenüberliegende Seite*): Vergleich der Urinproben von a), b) Passivrauchern mit denen von c) - f) Rauchern. Alle Proben wurden, wie in Kap. 7.3.5 beschrieben, hydrolysiert, ausgeschüttelt und derivatisiert. Nach 25minütiger Extraktion aus dem Headspace bei 60°C mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser wurden die Proben mit GC-MS bestimmt (vgl. Tab. 29 auf Seite 155). Den Proben a) - d) wurde vor der Lagerung 5 mL HCl (6 mol/L) und 50 µg 4AT je 100 mL zugesetzt. Gezeigt ist die Massenspur 127 m/z. Die Nummern beziehen sich auf die Verbindungen in Tab. 30 auf Seite 158.

7.4 Quantifizierung

In diesem Kapitel wurden die Derivate aromatischer Amine mit GC-MS bestimmt. Statt aus dem Headspace wie in Kap. 7.3.3 wurden die Verbindungen mittels Autosampler direkt extrahiert. Die Optimierung der Extraktionsbedingungen ist in Kap. 7.4.2 und die Bestimmung der Verfahrensparameter in Kap. 7.4.3 beschrieben. Das in-situ Derivatisierung-SPME-GC-MS-Verfahren wurde abschließend zur Bestimmung aromatischer Amine im Abwasser von Rüstungsaltslasten verwendet (vgl. Kap. 7.4.4 bzw. 7.4.5).

7.4.1 Trennung und Identifizierung der Substanzen

7.4.1.1 Gaschromatographische Trennung der Derivate

Für die Trennung der Analyten wurde ein Gaschromatograph der Firma Varian (Modell Star 3800) verwendet. Die Derivate wurden massenspektrometrisch mit einem Saturn 2000 Ion-trap-Massenspektrometer (Firma Varian, vgl. Kapitel 7.4.1.3) detektiert. Die Verdampfung der Proben erfolgte in einem PTV-Injektor (Modell 1079, Fa. Varian). Hierbei wurde bei Flüssiginjektion ein Fokus-Liner mit 3,4 mm ID gefüllt mit Quarzwolle und für SPME ein Insert-Liner mit 0,8 mm ID benutzt (vgl. Tab. 31). Für die Probenaufgabe bei Flüssiginjektion wie SPME sorgte ein Autosampler der Firma Varian (Modell 8200CX).

Versuche zur Verbesserung der chromatographischen Bedingungen wurden mit einem Standard der Derivate in Essigsäureethylester durchgeführt: Zu 10 mL Wasser wurde 1 mL eines methanolischen Standards der Analyten ($\beta = 10$ mg/L) gegeben. Es wurde, wie unter Kapitel 7.1.1 beschrieben, derivatisiert. Anschließend wurden 2 mL Essigsäureethylester zugegeben und 5 min geschüttelt. Ein Aliquot der organischen Phase wurde in ein 1,5 mL Vial transferiert. Für die Optimierung wurde jeweils 1 μ L injiziert. Diese Menge erwies sich als ausreichend für alle Optimierungen und stabil über die gesamte Zeit der Messungen.

Die Verwendung eines PTV-Temperaturprogramms war von Vorteil, da so eine explosionsartige Verdampfung des Lösungsmittels verhindert werden konnte (vgl. Tab. 31).

Dies gilt auch für SPME, da eingeschlossenes und anhaftendes Wasser sich negativ auf die Lebensdauer der Faser auswirkt [149].

Bei der Auswahl der chromatographischen Säule konnte zum einen auf frühere Ergebnisse zurückgegriffen werden: Gute Resultate wurden mit einer DB5-Säule [175, 271, 325] oder Säulen vergleichbarer Polarität gemacht [149]. Zum anderen lagen positive Erfahrungen mit einer Stx-CLPesticides-Säule vor [326]. Diese verfügt neben einer ähnlichen Polarität über eine spezielle Siltek-Deaktivierung, die für thermisch labile Verbindungen durch Verminderung des Zerfalls eine höhere Empfindlichkeit gewährleisten soll. Angesichts des erwähnten Vorteils zusammen mit einer der DB5 vergleichbaren Polarität wurde diese Säule für die Trennung verwendet. Die Trennsäule wurde mit Vorsäule bzw. Transferline installiert (vgl. Tab. 31).

An das GC-Programm wurde der Anspruch gestellt, die Analyten möglichst vollständig zu trennen. Zwar ist bei massenspektrometrischer Detektion im fullscan-Modus auch eine Unterscheidung über charakteristische Fragmentationen möglich. Diese Möglichkeit scheidet aber aus, wenn wie in diesem Fall Isomere mit sehr ähnlichen Massenspek-

Tabelle 31: Optimierte Bedingungen zur Trennung der Derivate mit GC-MS mit Stx-CLPesticides-Säule

Gerät	GC-MS Varian Star 3800 mit Ion-trap Saturn 2000
Trennsäule	Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Vorsäule, Transferline	je 1,5 m desaktivierte fused-silica Kapillare, 0,25 mm ID
Injektor	1079 PTV-Injektor (Fa. Varian) mit 0,8 mm ID SPME-Liner
Injektortemperatur	50°C für 0,2 min halten, mit 200°C/min auf 250°C heizen
Split	nach 3 min Splitventil öffnen (Verhältnis 1:100)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
GC-Programm	40°C für 3 min halten; mit 15°C/min auf 130°C heizen; mit 30°C/min auf 160°C heizen, 5 min halten; mit 30°C/min auf 200°C heizen; mit 20°C/min auf 250°C heizen, 0,17 min halten (insgesamt: 19 min)

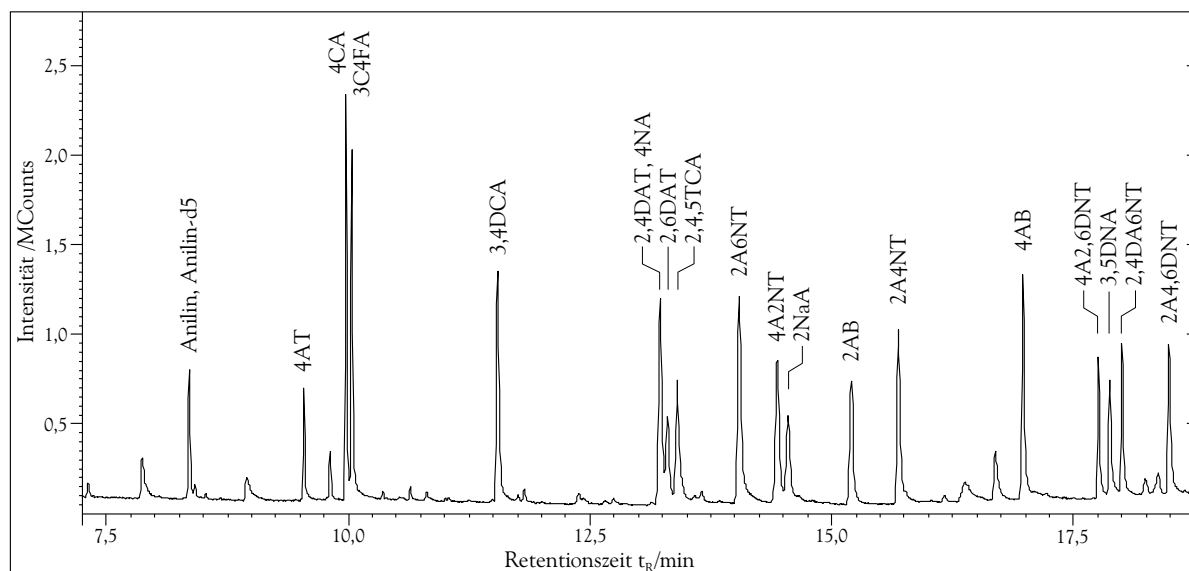


Abbildung 49: Chromatogramm eines Standards nach Derivatisierung, der die in Tab. 32 aufgeführten Analyten enthielt. Die Trennung erfolgte mit GC-MS mit einer Stx-CLPesticides-Säule unter Verwendung des in Tab. 31 beschriebenen Temperaturprogramms. Injiziert wurde 1 μL des Essigsäureethylester-Extrakts. Von jedem Derivat wurden zwischen 7,8 und 14,1 ng aufgegeben. Das Chromatogramm zeigt den Totalionenstrom.

tren vorliegen. Darüber hinaus sind viele Analyten strukturell eng verwandt, so dass hier Verwechslungen und Störungen auftreten können. Mit dem in Tab. 31 aufgeführten Temperaturprogramm wurden in dieser Hinsicht gute Resultate erzielt. Abb. 49 zeigt ein Chromatogramm, das mit dem Temperaturprogramm aufgenommen wurde. Es wurde 1 μL des o.g. Essigsäureethylester-Standards entsprechend 5 ng jedes Analyten aufgegeben. Bei Betrachtung des Totalionenstroms konnten die Derivate von Anilin und Anilin-d5 sowie 2,4DAT, 2,6DAT und 4NA nur unzureichend getrennt werden. Die Retentionszeiten der Analyten sind in Tab. 32 zusammengefasst. Durch Verwendung von Einzelmassenspuren bei der Quantifizierung können auch die genannten koeluiierenden Substanzen weitestgehend basisliniengetrennt untersucht werden. Darüber hinaus traten in dem Chromatogramm einige Peaks auf, die auf Nebenreaktionen zurückgeführt werden können (vgl. Kap. 7.1.4). Diese machten sich hier besonders zahlreich bemerkbar, da die Probe anders als bei den SPME-Experimenten ca. 9 % Methanol enthielt. Einige weitere Peaks stammten zudem von Verunreinigungen wie Phthalaten.

Tabelle 32: Im Rahmen der Quantifizierung untersuchte Analyten mit Abkürzungen. Die Retentionszeiten der Derivate beziehen sich auf die Bestimmung mit GC-MS mit einer Stx-CLPesticides- bzw. DB5-ms- Säule.

Analyt	Abkürzung	Retentionszeit t_R /min	
		CLPesticides ^a	DB5-ms ^b
Anilin-d5 (IS)	A-d5	8,35	7,69
Anilin	A	8,36	7,73
4-Aminotoluol	4AT	9,54	9,25
4-Chloranilin	4CA	9,98	9,93
3,4-Dichloranilin	3,4DCA	11,55	11,70
2,4,5-Trichloranilin	2,4,5TCA	13,41	14,20
3-Chlor-4-fluoranilin	3C4FA	10,04	9,85
2,4-Diaminotoluol	2,4DAT	13,22	14,22
2,6-Diaminotoluol	2,6DAT	13,31	14,12
2-Naphthylamin	2NaA	14,59	15,20
2-Aminobiphenyl	2AB	15,20	16,67
4-Aminobiphenyl	4AB	16,98	18,82
4-Nitroanilin	4NA	13,22	12,62
3,5-Dinitroanilin	3,5DNA	17,88	18,20
2-Amino-4-nitrotoluol	2A4NT	15,69	14,87
2-Amino-6-nitrotoluol	2A6NT	14,05	13,47
4-Amino-2-nitrotoluol	4A2NT	14,44	13,65
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	2A4,6DNT	18,49	19,24
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	4A2,6DNT	17,76	18,32
2,4-Diamino-6-nitrotoluol	2,4DA6NT	18,00	19,61

Messbedingungen vgl. ^a Tab. 31 auf Seite 165 bzw. ^b Tab. 33 auf Seite 169.

Ein weiterer Vorteil des Temperaturprogramms ist die Elution aller Analyten in nur 19 min. Dadurch wird ein effektives Arbeiten mit hohem Probendurchsatz möglich. Zudem werden die Analyten bereits bei niedrigen Temperaturen eluiert. Das zu hohen

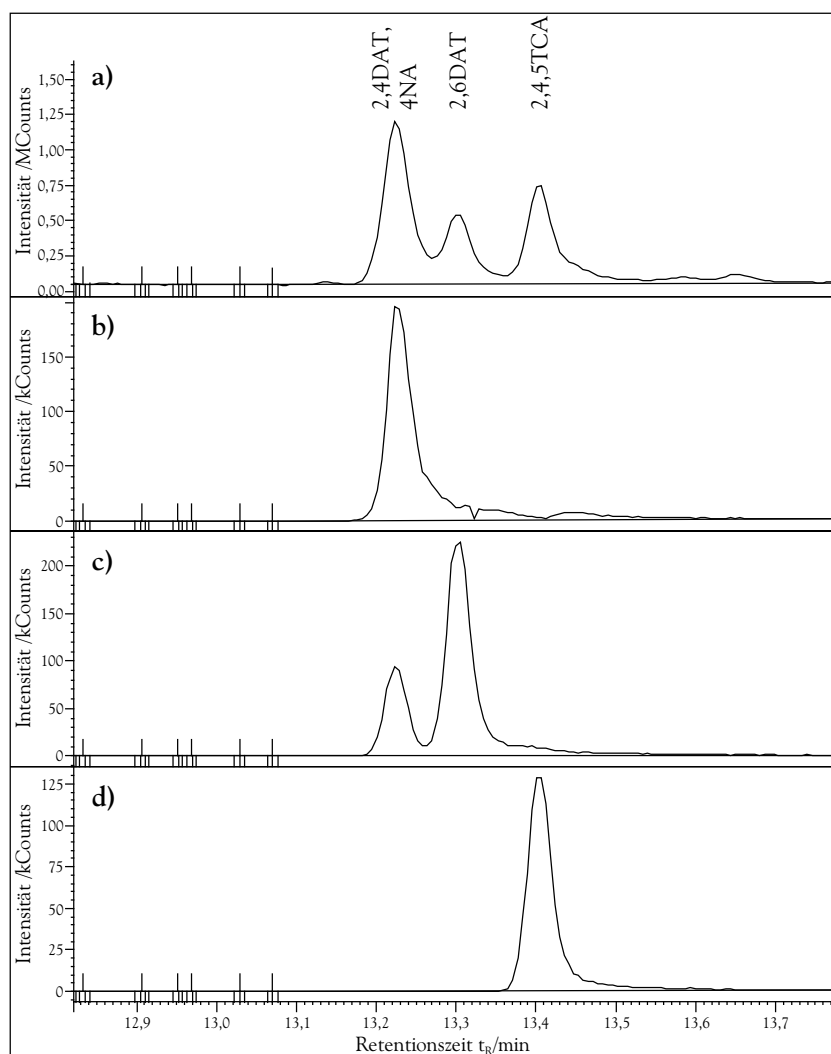


Abbildung 50: Trennung der Derivate über die Einzelmassenspuren. Die Abbildung zeigt Chromatogramme a) des Totalionenstroms TIC bzw. der Einzelmassenspuren b) 249 m/z des Derivats von 4NA, c) 344 m/z von 2,4DAT und 2,6DAT, d) 308 m/z von 2,4,5TCA. Die Trennung erfolgte unter den in Tab. 31 auf Seite 165 aufgeführten Bedingungen.

Temperaturen zunehmende Säulenbluten macht sich dadurch kaum störend bemerkbar. Die Stx-CLPesticides-Säule wurde für alle weiterführenden Experimente verwendet. Sowohl das GC- als auch das PTV-Programm konnten direkt von Flüssiginjektion auf SPME übertragen werden, wobei die chromatographischen Eigenschaften der Derivate unverändert blieben.

7.4.1.2 Vergleich mit einer anderen Trennsäule

Zum Vergleich wurde neben der Stx-CLPesticides auch eine DB5-ms für die Trennung der Analyten verwendet. Eine Säule mit derartiger Polarität war bereits früher eingesetzt worden [175, 271, 325]. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Filmdicke statt der üblichen 0,25 μm lediglich 0,1 μm betrug. Dies äußerte sich bei gleicher Flussrate in deutlich geringeren Elutionstemperaturen: Während bei der Stx-CLPesticides 250°C notwendig waren, erfolgte die Elution aller Analyten mit der DB5-ms bereits bei 200°C (vgl. Tab. 33). Gleichzeitig führt die Verringerung der Filmdicke zu einer Erhöhung des Phasenverhältnisses (Verhältnis von Innenvolumen der Kapillare zum Volumen der Beschichtung). Dadurch wird eine höhere Trennleistung erreicht. Diese zeigte sich bei der teilweisen Trennung der Derivate von Anilin und Anilin-d5 sowie in schmalere Peaks (vgl. Abb. 49 und 51 auf den Seiten 166 bzw. 170). Es ist aber auch mit dieser Säule nicht möglich, alle Peaks vollständig zu trennen.

Wie die Chromatogramme in den Abb. 49 und 51 auf den Seiten 166 und 170 zeigen, ähneln sich die beiden GC-Säulen sehr. Bei vergleichbaren Temperaturprogrammen er-

Tabelle 33: Optimierte Bedingungen zur Trennung der Derivate mit GC-MS mit DB5-ms- Säule

Gerät	GC-MS Varian Star 3800 mit Ion-trap Saturn 2000
Trennsäule	DB5-MS, 30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,1 μm Filmdicke
Vorsäule, Transferline	je 1,5 m desaktivierte fused-silica Kapillare, 0,25 mm ID
Injektor	1079 PTV-Injektor (Fa. Varian) mit 0,8 mm ID SPME-Liner
Injektortemperatur	50°C für 0,2 min halten, mit 200°C/min auf 250°C heizen
Split	nach 3 min Splitventil öffnen (Verhältnis 1:100)
Trägergas	Helium, 2 mL/min
GC-Programm	40°C für 3 min halten; mit 12°C/min auf 110°C heizen; mit 30°C/min auf 140°C heizen, 5 min halten; mit 10°C/min auf 170°C heizen; mit 20°C/min auf 200°C heizen, 1,52 min halten (insgesamt: 21 min)

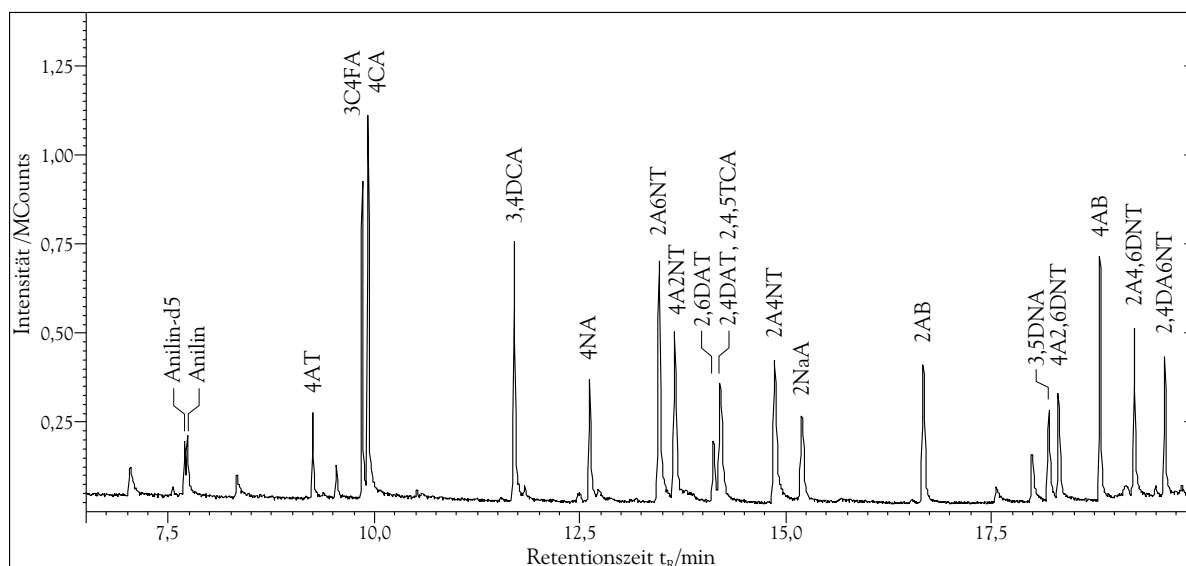


Abbildung 51: Chromatogramm eines Standards nach Derivatisierung, der die in Tab. 32 auf Seite 167 aufgeführten Analyten enthielt. Die Trennung erfolgte gemäß Tab. 33 mit GC-MS und einer DB5-ms-Säule. Injiziert wurde 1 μL des Essigsäureethylester-Extrakts. Von jedem Derivat wurden zwischen 7,8 und 14,1 ng aufgegeben. Das Chromatogramm zeigt den Totalionenstrom.

fordern die chromatographischen Läufe 19 resp. 21 min (vgl. Tab. 31 und 33 auf den Seiten 165 bzw. 169). Lediglich die Elutionsreihenfolge einiger Analyten ist angesichts eines anderen Säulenmaterials vertauscht. Deshalb wurde die Stx-CLPesticides-Säule auch für die folgenden Untersuchungen verwendet.

7.4.1.3 Massenspektrometrische Detektion

Die Detektion erfolgte mit einem Saturn 2000 Ion-trap-Massenspektrometer (Fa. Varian). Die Messdaten wurden im fullscan-Modus in einem Massenbereich von 60 bis 450 m/z aufgezeichnet (vgl. Tab. 34). So konnten die Analyten jederzeit über ihre Massenspektren identifiziert und die Chromatogramme auf unbekannte Substanzen untersucht werden. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoss mit 70 eV.

Zur Identifizierung wurde eine eigene Spektrenbibliothek erstellt, da für viele Derivate keine Spektren verfügbar sind und diese stark vom verwendeten Gerät abhängen (vgl. Kap. 7.1.7). Die Spektren sind in Anhang 12.1 ab Seite 275 abgedruckt und stammen aus Chromatogrammen, die mit dem in Kapitel 7.4.1.1 beschriebenen Essigsäureethylester-Standard aufgenommen wurden. Injiziert wurde jeweils 1 µL des Standards entsprechend zwischen 7,8 und 14,1 ng jedes Analyten. Bei koeluirierenden Substanzen wurden die entsprechenden Einzelstandards verwendet. In Tab. 35 sind neben dem Molpeak der Basispeak sowie weitere charakteristische Massen mit ihren relativen Intensitäten aufgeführt.

Tabelle 34: Parameter der massenspektrometrischen Detektion mit dem Saturn 2000 Ion-trap-MS

Gerät	Varian Saturn 2000 ion-trap MS
Ionisation	EI, 70 eV
Massen-Bereich	60 - 450 m/z, fullscan
Scan time	0,35 s/scan
Multiplier-Spannung	1600 V
Emission Current	40 µA
Target Value TIC	20000 counts
Prescan, Max. Ionization Time	100 µs, 25000 µs
Trap-, Transferline- Manifold-Temperatur	200°C, 280°C, 55°C

Tabelle 35: Charakteristische Fragmentationen der Derivate. Die Verbindungen wurden mit einem Saturn 2000 ion-trap Massenspektrometer nach gaschromatographischer Trennung detektiert (vgl. Tab. 34). Über das Fragmentation des Basispeaks wurde zugleich auch quantifiziert.

Analyt	Basispeak & Quant.ion	Molekülion (rel. Int.)	charakteristische Fragmentationen (rel. Int.)
Anilin-d5	209	209 (100)	82 (38), 127 (7), 210 (6)
Anilin	204	204 (100)	77 (40), 127 (10), 74 (8), 205 (8)
4AT	218	218 (100)	91 (45), 65 (25), 63 (10), 127 (8)
4CA	238	238 (100)	111 (53), 75 (40), 240 (36), 113 (20)
3,4DCA	272	272 (100)	274 (66), 145 (44), 147 (34), 109 (32)
2,4,5TCA	306	306 (100)	308 (100), 310 (34), 179 (29), 181 (28)
3C4FA	256	256 (100)	129 (38), 258 (28), 109 (17), 74 (12)
2,4DAT	344	344 (100)	217 (23), 90 (18), 89 (17), 345 (7)
2,6DAT	344	344 (100)	217 (17), 90 (12), 89 (11), 345 (8)
2NaA	254	254 (100)	127 (45), 126 (11), 255 (10), 74 (6)
2AB	280	280 (100)	152 (23), 153 (12), 281 (9), 151 (7)
4AB	280	280 (100)	152 (19), 281 (16), 153 (8), 151 (8)
4NA	249	249 (100)	76 (57), 219 (57), 203 (37), 191 (19)
2A4NT	263	263 (100)	90 (28), 89 (27), 63 (14), 105 (12)
2A6NT	246	263 (2)	89 (26), 119 (21), 90 (20), 63 (18)
4A2NT	246	263 (7)	89 (30), 90 (22), 119 (22), 63 (20)
2A4,6DNT	291	308 (5)	164 (20), 89 (16), 63 (16), 62 (7)
4A2,6DNT	291	308 (1)	89 (35), 63 (29), 261 (18), 62 (18)
2,4DA6NT	372	389 (5)	344 (25), 216 (22), 89 (21), 63 (16)

Die Massenspektren der Derivate sind überwiegend einfach und zeigen kaum Fragmentierung. Dies ist für die Identifizierung von Nachteil, erhöht aber die Empfindlichkeit. Für die Quantifizierung wurde bei allen Analyten der Basispeak ausgewählt. Die Analyten wurden anhand ihrer Massenspektren zugeordnet. Bei isomeren Verbindungen erfolgte die Peakzuordnung anhand von Einzelstandards.

7.4.1.4 Einfluss der Trap-Temperatur

Zur Erörterung der Frage, ob die Trap-Temperatur einen Einfluss auf die Empfindlichkeit hat, wurden bei 150°C, 200°C und 250°C jeweils 5 Chromatogramme aufgezeichnet. Die Temperatur wurde dazu auf die genannten Werte geregelt und nach der Äquilibration wurde eine Massenkalisierung durchgeführt. Auf ein Multiplier-Tune wurde verzichtet, da die Registrierung für alle Messungen unverändert sein sollte. Es wurde jeweils 1 µL des in Kapitel 7.4.1.1 beschriebenen Essigsäureethylester-Standards injiziert. Die Auswertung erfolgte sowohl über die in Tab. 35 aufgeführten Einzelmassenspektren als auch über den Totalionenstrom.

Die Mittelwerte der Peakflächen jeder Messreihe (n= 5) sind in Abb. 52 zusammen mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken aufgeführt. Die Auswertung erfolgte in diesem Fall über die Einzelmassenspektren. Für den Großteil der Verbindungen wurden die größten Peakflächen mit einer Trap-Temperatur von 150°C erreicht. Demgegenüber waren bei höheren Temperaturen häufig weniger chemische Ionisation, eine für Ion-trap-Geräte typische Nebenreaktion erkennbar an [M+1]-Peaks, zu beobachten. Lediglich bei den spät eluierenden Derivaten liegt das Optimum bei 200°C. Auch der Hersteller empfiehlt die Verwendung einer möglichst niedrigen Trap-Temperatur. Diese kann häufig 50 bis 75°C unter der GC-Endtemperatur liegen, ohne dass Auflösung oder Empfindlichkeit darunter leiden. Dies ist auf die Speichereigenschaften zurückzuführen, die bei höheren Temperaturen durch ein zunehmendes Maß an Stößen verschlechtert werden. Unter Berücksichtigung der spät eluierenden Substanzen wurde für alle weiteren Messungen eine Temperatur von 200°C gewählt.

Der Einfluss der Temperatur auf die Fragmentierung konnte dagegen nicht nachgewiesen werden: Zum Vergleich wurde auch über den Totalionenstrom ausgewertet und beide Werte zueinander in Relation gesetzt. Das Verhältnis blieb jedoch für alle Analyten konstant. Dies zeigt, dass die mit steigender Temperatur zunehmende Fragmentierung vernachlässigt werden kann.

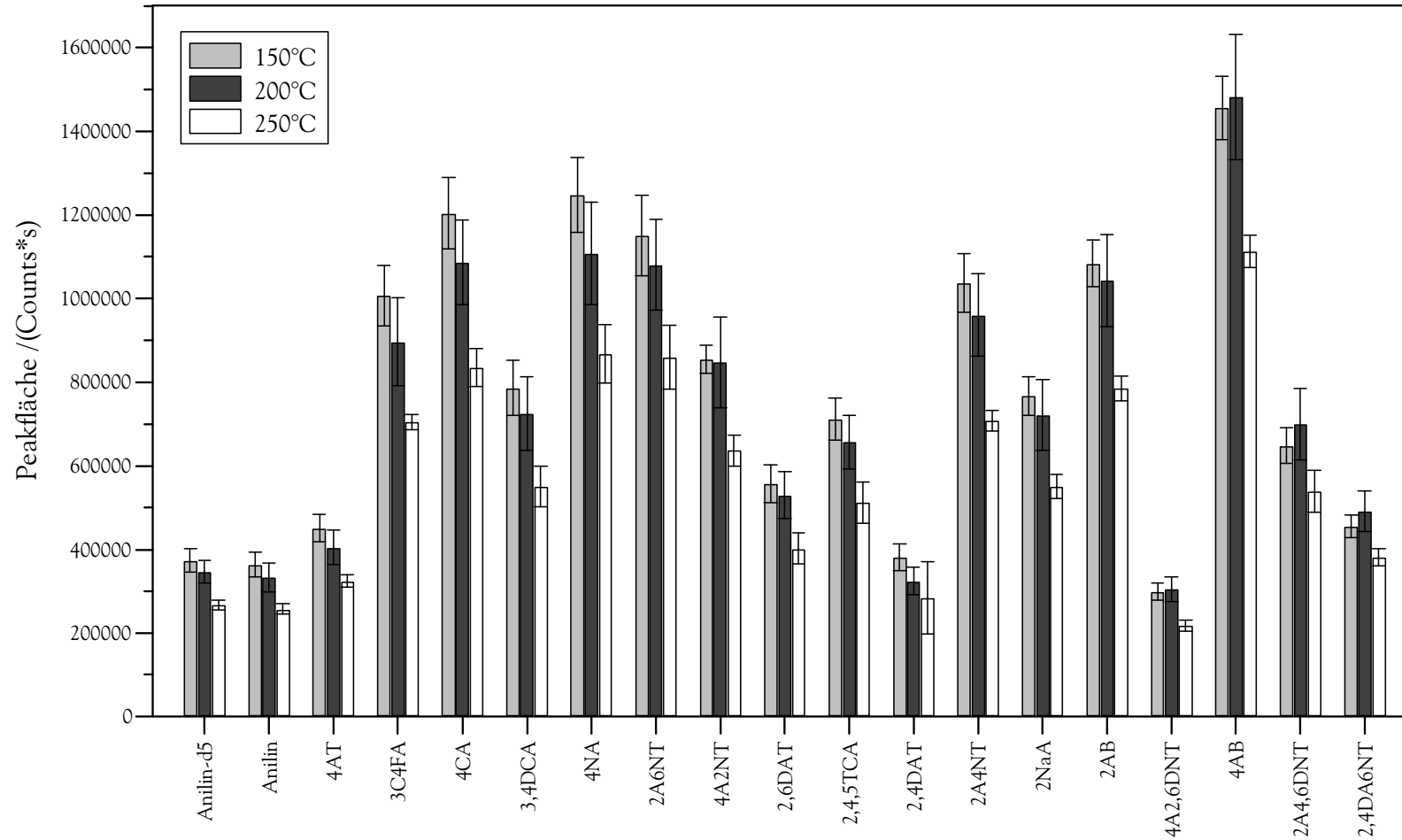


Abbildung 52: Einfluss der Trap-Temperatur auf die Empfindlichkeit. Für jede Temperatur wurden n= 5 Messungen durchgeführt (vgl. Tab. 33 und 34 auf den Seiten 169 und 171). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der Peakflächen sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken.

7.4.2 Direct-SPME

7.4.2.1 Durchführung

Die Festphasenmikroextraktion wurde in 13 mL Vials durchgeführt, die mit Aluminiumfolie verschlossen wurden. Zusätzlich wurden sie mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt. Die wässrigen Proben zzgl. Reagenzien mit einem Gesamtvolumen von ca. 12,6 mL wurden unmittelbar nach der Derivatisierung in diese Vials umgefüllt und verschlossen. Dadurch stand fast kein Headspace-Raum zur Verfügung. Das Probevolumen wurde mit 10 mL so gewählt, dass die Reagenzien präzise abmessbar waren, ohne eine unnötige Verdünnung zu bewirken. Durch das große Probevolumen im Verhältnis zur Oberfläche wurde nach GÓRECKI *et al.* eine eventuelle Sorption an den Glaswandungen minimiert [156].

Der pH-Wert wurde nach der Derivatisierung durch Zugabe von 400 μL Natronlauge (5 mol/L) sowie 250 μL DI-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (0,25 mol/L) auf pH 9 eingestellt (vgl. Tab. 36). Der pH-Wert wurde abgepuffert, um eine bessere Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Zudem eignen sich SPME-Fasern nur für gemäßigte pH-Werte. Obwohl der Hersteller einen Arbeitsbereich zwischen pH 2 und 11 empfiehlt, wurde von MILLS *et al.* eine Ablösung der Beschichtung bei pH 2 beobachtet [285].

Auf die Zugabe von Salz zur Aussalzung der Analyten wurde verzichtet. Die Einstellung einer entsprechend hohen Salzkonzentration zieht bei Zugabe einer hochkonzentrierten Salzlösung einen Verdünnungseffekt nach sich oder ist durch das Abwiegen fester Mengen arbeitsaufwendig. Zudem kamen Untersuchungen von KELZ mit aromatischen

Tabelle 36: Optimierte Bedingungen für die direkte Extraktion der Derivate mit SPME

Faserbeschichtung	65 μm PDMS/DVB
Probevolumen	10 mL zzgl. Reagenzien
pH-Wert	≈ 9
Salzzugabe	keine
Extraktion	30 min, Durchmischung durch Vibration der Faser
Desorption	5 min bei 250°C

Aminen nach Derivatisierung zu uneinheitlichen Ergebnissen [149]: So wirkte sich eine Salzkonzentration von 18 g/L auf die Extraktion aller nitrosubstituierten Verbindungen positiv aus, während sie sich ansonsten nachteilig bemerkbar machte. Weiterhin wurde bei hohen Salzkonzentrationen die Kontamination von Injektorblock und Vorsäule sowie die rasche Ablösung der Faserbeschichtung beobachtet [149, 155, 327].

Zur Extraktion wurde eine PDMS/DVB-Faser mit einer Beschichtungsdicke von 65 μm verwendet. Diese wurde in die Flüssigkeit eingetaucht (direct-SPME) und durch Vibration der Faser durchmischt. Die Extraktionszeit wurde mit 30 min an das GC-Programm angepasst, um einen möglichst hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Da die Äquilibrierungszeiten deutlich größer sind und somit nicht unter Gleichgewichtsbedingungen gearbeitet wurde, war eine präzise Einhaltung der Extraktionszeiten notwendig. Dies wurde durch Verwendung eines Autosamplers (Modell 8200CX mit SPME Kit III, Fa. Varian) realisiert.

Für die Desorption im Injektor des GC wurde ein spezielles SPME-Insert mit 0,75 mm ID verwendet, um Verluste bei der Desorption zu verringern und eine bessere Fokussierung zu gewährleisten [284]. Zusätzlich verfügte das Insert über eine Siltek-Deaktivierung, die eine möglichst schonende Desorption garantieren sollte.

Die Faser wurde 5 min im Injektor belassen, um eine vollständige Desorption zu erreichen. Gleichzeitig sollte so einer Verschleppung entgegengewirkt und Matrixbestandteile entfernt werden. Die Höchsttemperatur des Injektors orientierte sich an dem vom Hersteller empfohlenen Wert, obwohl VAN DOORN *et al.* von einer Überschreitung berichten, ohne dass die Faser dabei Schaden nahm [210]. Mit Hilfe des PTV-Programms konnte verhindert werden, dass sich die Faser zu rasch erhitzte und dabei durch explosionsartig verdampfendes Wasser Schaden nahm (vgl. Kapitel 7.4.1.1).

Die gute Reproduzierbarkeit und die lange Lebensdauer der SPME-Fasern sprechen für die gewählten Bedingungen. So konnten die Fasern bis zu 80 mal verwendet werden, bevor Kapazitätsverlust oder Ablösung der Beschichtung eine Weiterverwendung verhinderten. Zur Fokussierung der flüchtigen Analyten auf der GC-Säule erwies sich eine GC-Starttemperatur von 40°C als zweckmäßig. Als Nachteil der verwendeten Faser ist das starke Faserbluten zu nennen, das auch nach häufiger Verwendung oder

längerzeitigem Ausheizen nicht nachließ. Das Faserbluten störte jedoch nicht bei der Quantifizierung über die charakteristischen Einzelmassenspuren.

7.4.2.2 Vergleich verschiedener SPME-Fasern

Die Wahl der optimalen SPME-Faser gestaltet sich häufig schwierig. So sind eine Vielzahl unterschiedlicher Fasern erhältlich. Diese unterscheiden sich neben dem Beschichtungsmaterial und dessen Polarität in der Filmdicke, der Oberfläche und dem Sorptionsprinzip (Verteilung/Adsorption).

Da eine Vorhersage dadurch sehr schwer ist, wird der Faservergleich unverzichtbar. Dies betrifft in besonderem Maße unbekanntes Verbindungen wie die untersuchten Iod-Verbindungen, für die es bislang kaum Vergleiche gibt [149, 328, 329]. Ausgewählt wurden Fasern, die zum einen auf Polydimethylsiloxan (PDMS) aufbauen wie PDMS, PDMS/DVB, DVB/Car/PDMS und Car/PDMS (vgl. Tab. 3), da dieses Material häufig für unpolare Verbindungen empfohlen wird. Zum anderen wurden mit PDMS/DVB, CW/DVB und DVB/Car/PDMS Fasern verglichen, die auf DVB aufbauen.

Für jede Faser wurden 5 Lösungen hergestellt. Dazu wurden je 10 mL der wässrigen Probe, die die Analyten in einer Konzentration von 0,5 µg/L enthielt, wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben, derivatisiert. Für jede Faser wurden neue Proben derivatisiert. Vor Beginn der Messungen wurden neue Fasern gemäß Herstellerangaben für 0,5 bis 4 h konditioniert. Bereits gebrauchte wurden für 30 min bei 250°C im Injektor des GC ausgeheizt. Abgesehen von den variierenden SPME-Fasern galten die allgemeinen in Tab. 36 auf Seite 175 aufgeführten Extraktions- und Desorptionsbedingungen. Da sich die empfohlenen Desorptionsbedingungen für die meisten Fasern kaum unterscheiden, wurde eine einheitliche Injektortemperatur von 250°C gewählt, die in allen Fällen mit den Herstellerangaben vereinbar ist. Lediglich bei Car-PDMS ist die Injektortemperatur mit 250°C am unteren Ende des empfohlenen Bereichs.

Die Mittelwerte der Peakflächen sind in Abb. 53 für die einzelnen Analyten dargestellt. Bei der Faser mit Car/PDMS-Beschichtung zeigte sich eine geringe Eignung: Lediglich bei den Derivaten von Anilin, Anilin-d5, 4AT, 4CA, 3,4DCA und 3C4FA erreichte die

Faser Extraktionsausbeuten $> 20\%$ bezogen auf die PDMS/DVB-Faser (vgl. Abb. 53). Es fällt auf, dass es sich bei den genannten Analyten um die kleinsten Moleküle handelt. Abgesehen von Wechselwirkungskräften spielt hier auch die Größe der Analyten eine bedeutende Rolle. Dies ist auf die Beschaffenheit des Carboxen-Materials zurückzuführen: Es handelt sich um Carboxen 1006, das mit einer ungefähren Oberfläche von $715\text{ m}^2/\text{g}$ mikroporös ist [92] und vom Hersteller nur für Analyten mit einem Molgewicht bis 275 g/mol empfohlen wird. Obwohl es sich bei Car-PDMS um einen Verbund zweier Materialien handelt, gehen interessanterweise die Eigenschaften des PDMS nahezu gänzlich verloren und die Extraktion wird maßgeblich durch das Carboxen bestimmt. Offenbar ist das Carboxen als Schicht auf das PDMS aufgebracht, so dass dieses selbst kaum zugänglich ist.

Dagegen ist bei der PDMS-Faser die Beschichtung als viskoser Flüssigkeitsfilm aufgebracht [97]. Diese ist als stationäre Phase für die Gaschromatographie bekannt und eignet sich besonders für unpolare Analyten. Dies zeigt sich auch hier: Alle Verbindungen mit $\log K_{\text{OW}} < 3,5$ wurden nur in geringem Maße auf der Faser angereichert (vgl. Abb. 53). Hierbei handelt es sich um alle Nitroverbindungen (abgesehen von 2,4DA6NT) sowie Anilin und Anilin-d5. Umgekehrt ist die PDMS-Faser für die wenig polaren Verbindungen wie 2,4,5TCA, 3,4DCA sowie 2,4DAT und 2,6DAT der PDMS/DVB-Faser vergleichbar. Für letztere scheint sie bei direkter Extraktion eine echte Alternative zu sein, zudem sie als ausgesprochen robust und beständig beschrieben wird [97].

Mit der PDMS/DVB-Faser wurden die besten Ergebnisse erzielt: Bei allen Analyten wurden die höchsten Extraktionsausbeuten beobachtet (vgl. Abb. 53). Dies gilt insbesondere für die polaren der untersuchten Analyten. Angesichts dieser einseitigen Ergebnisse wurde das Experiment mit einer zweiten PDMS/DVB-Faser wiederholt und bestätigt.

Dieser Faser vergleichbar ist nur die DVB/Car/PDMS-Faser. Die Extraktionsausbeuten betragen durchschnittlich 75% verglichen mit den Extraktionsausbeuten der PDMS/DVB-Faser (vgl. Abb. 53). Lediglich bei den Derivaten der polaren Analyten zeigte sie sich mit ca. 40% weniger gut geeignet.

Die Fasern auf Divinylbenzen-Basis weisen die besten Extraktionsausbeuten auf. Von

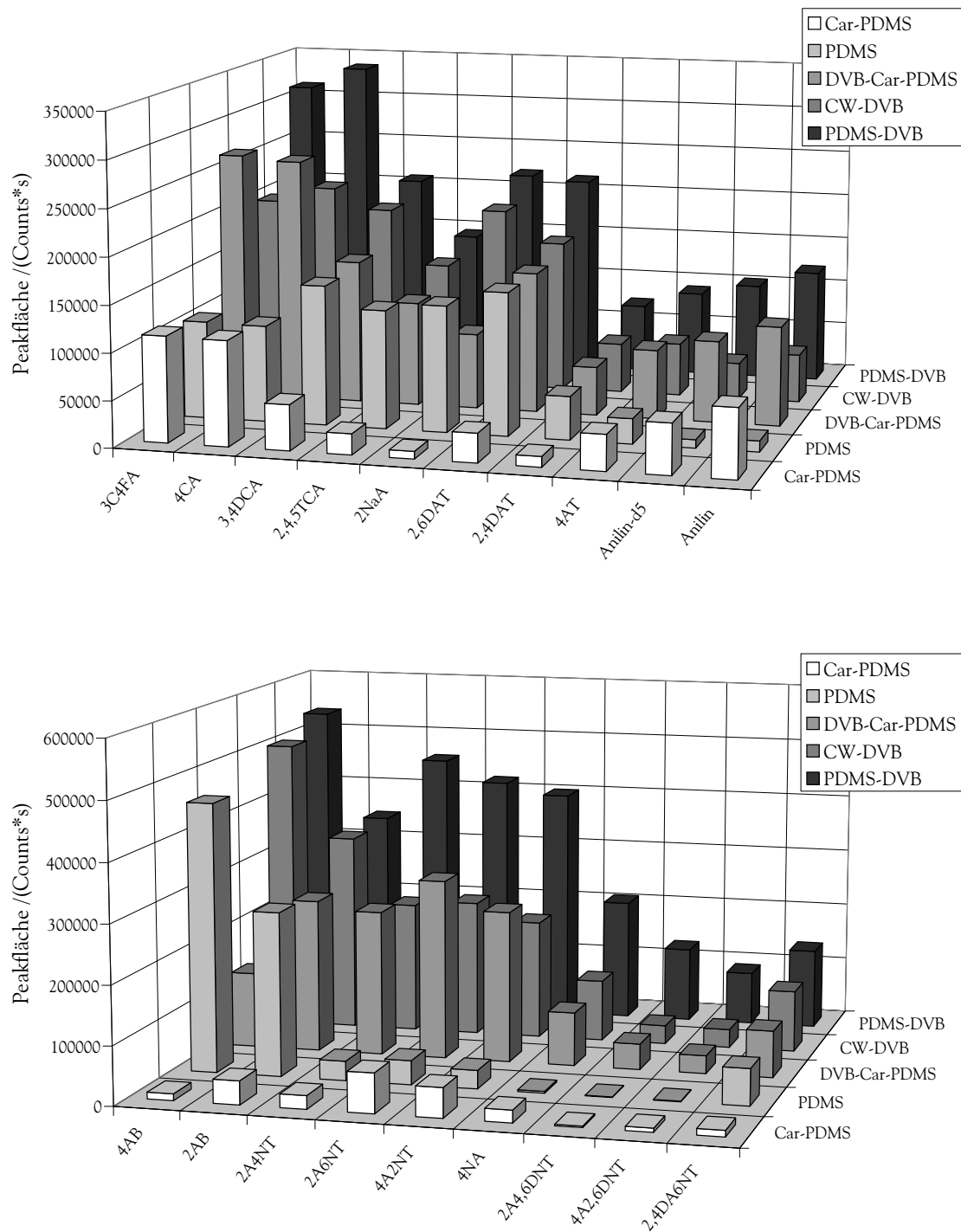


Abbildung 53: Vergleich verschiedener SPME-Fasern bei direkter Extraktion anhand der Peakflächen der Analyten. Bei einer Analytkonzentration von $0,5 \mu\text{g/L}$ wurden die Verbindungen nach Derivatisierung mittels Autosampler extrahiert. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert von $n=5$ Messungen.

wenigen Ausnahmen abgesehen, zeigen PDMS/DVB, CW/DVB und DVB/Car/PDMS für alle Analyten stets die besten Ergebnisse. Dies gilt in besonderem Maße für die Derivate der polareren nitrosubstituierten Analyten wie 2A4,6DNT, 4A2,6DNT und 4NA. Die Ursache liegt in der speziellen Beschichtung: Grundgerüst sind DVB-Partikel mit einer Oberfläche von $750 \text{ m}^2/\text{g}$, die von einer PDMS- bzw. CW-Schicht zusammengehalten werden [92]. Demzufolge beruht die Extraktion weniger auf Verteilung, wie beispielsweise bei PDMS, sondern auf Adsorption. Damit spielt die Zahl der Sorptionsstellen und die Oberfläche eine entscheidende Rolle und es tritt eine interessante Parallele zur Festphasenextraktion auf: PS-DVB-Polymere mit einer großen Oberfläche ($> 1000 \text{ m}^2/\text{g}$) erwiesen sich bei der Extraktion polarer Verbindungen als besonders leistungsfähig [168, 182, 196]. Verglichen mit dem gleichen Polymer mit kleinerer Oberfläche (ca. $500 \text{ m}^2/\text{g}$) zeigte das hochvernetzte Material bei der on-line SPE aufgrund größerer Durchbruchsvolumina wesentlich bessere Wiederfindungsraten [196]. Auf eine derartige Parallele zwischen SPE und SPME haben bereits DUGAY *et al.* hingewiesen [139]. Die Adsorption wurde bei der Theorie der SPME bislang wenig berücksichtigt. Welche Rolle die Oberfläche dabei spielt, wurde bislang kaum untersucht. Ebenso charakterisiert auch der Hersteller die Fasern, abgesehen vom verwendeten Material, ausschließlich über die Dicke der Beschichtung.

7.4.2.3 Bestimmung der Äquilibrierungszeiten

Für die untersuchten Analyten wurden Äquilibrierungskurven zur Bestimmung der Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts aufgenommen. Dazu wurden Lösungen verwendet, die die Analyten und Anilin-d5 in einer Konzentration von $0,5 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ enthielten. Die Proben wurden wie unter Kapitel 7.1.1 beschrieben derivatisiert und anschließend für 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min mit einer PDMS/DVB-Faser extrahiert. Für jede Messung wurde eine neue Probe verwendet. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde die gesamte Messreihe anschließend wiederholt. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen unter Verwendung der in Tab. 35 auf Seite 172 aufgeführten Quantifizierungen. Es wurde jeweils der Mittelwert der beiden Messreihen gebildet und dieser gegen die Äquilibrie-

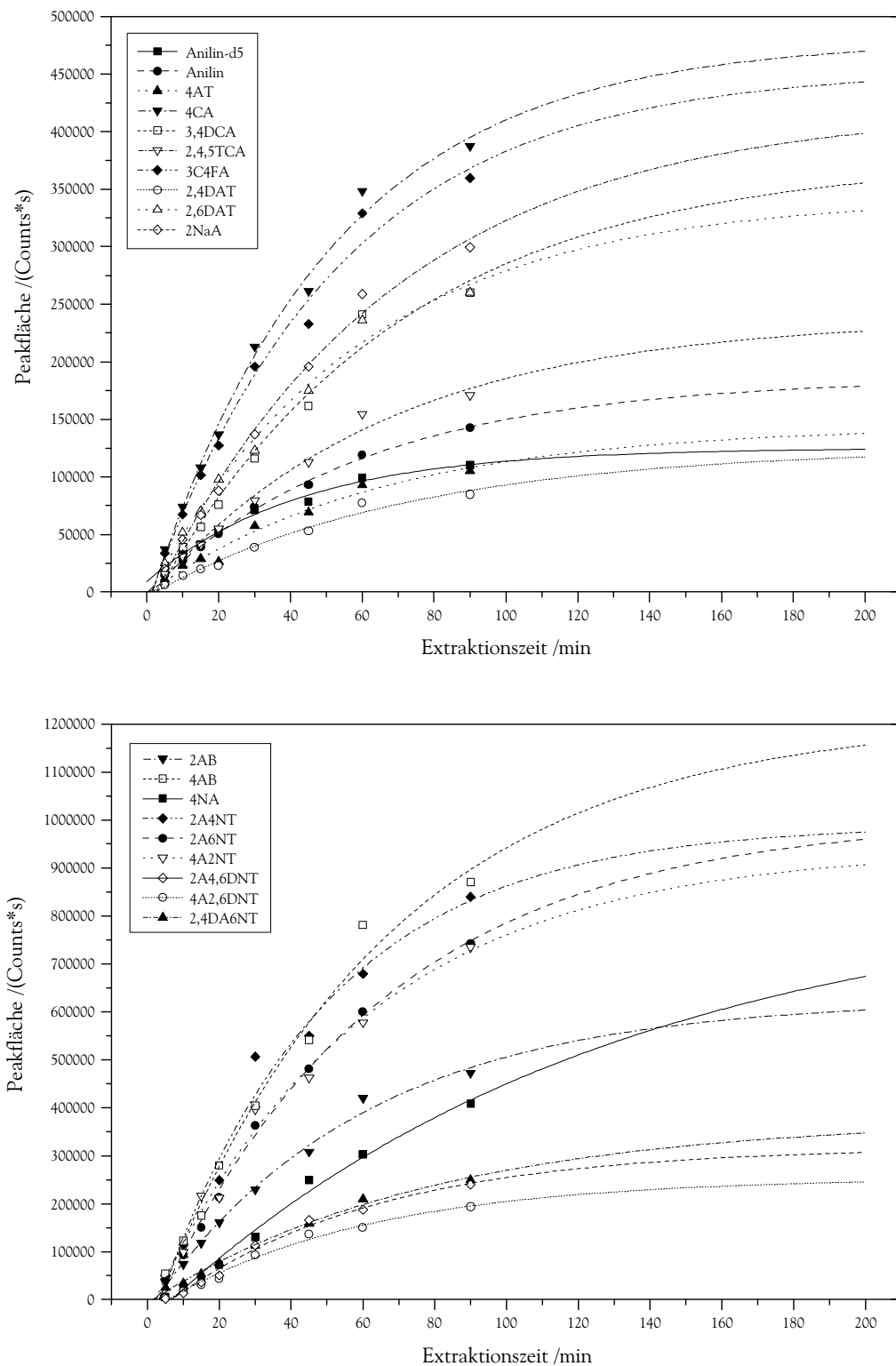


Abbildung 54: Äquilibrierungskurven der Derivate bei direkter Extraktion mit SPME. Nach der Derivatisierung wurden die Proben mit einer $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Ausgleichskurven wurden gemäß Gleichung (23) bestimmt (vgl. Seite 106).

rungszeit aufgetragen (vgl. Abb. 54).

Da die Gleichgewichtseinstellung nach 90 min noch nicht erreicht war, wurden die Äqui-

Tabelle 37: Berechnete Äquilibrierungszeiten der Derivate aromatischer Amine bei direkter Extraktion. Die Derivate wurden bei $n=8$ verschiedenen Extraktionszeiten zwischen 5 und 90 min mit einer $65\ \mu\text{m}$ PDMS/DVB-Faser mittels Autosampler angereichert.

Analyt	R^2 ^a	Äquilibrierungszeit /min ^b
Anilin-d5	0,991	125
Anilin	0,998	165
4AT	0,975	195
4CA	0,992	154
3,4DCA	0,980	209
2,4,5TCA	0,988	197
3C4FA	0,987	161
2,4DAT	0,981	219
2,6DAT	0,989	178
2NaA	0,994	203
2AB	0,993	179
4AB	0,987	194
4NA	0,990	382
2A4NT	0,981	145
2A6NT	0,997	196
4A2NT	0,994	192
2A4,6DNT	0,989	178
4A2,6DNT	0,988	175
2,4DA6NT	0,994	235

^a Korrelationskoeffizient der Ausgleichsrechnung nach Gleichung (23) auf Seite 106; ^b für $y = 0,95y_0$; GC-Parameter vgl. Tab. 31 auf Seite 165.

librierungszeiten mit einer Ausgleichskurve abgeschätzt. Dazu wurde wie in Kap. 7.3.3.4 vorgegangen. Die Parameter y_0 , A und t in Gleichung (23) auf Seite 106 wurden durch Regressionsanalyse für jeden Analyten bestimmt. Unter der Annahme, dass 95 % des Grenzwerts ($x \rightarrow \infty$) dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes entsprechen, gelangte man zu den in Tab. 54 zusammengefassten Äquilibrierungszeiten. Diese liegen zwischen 2 und 6 h und sind damit vergleichsweise lang. In einer Abschätzung von KELZ wurden für die gleichen Derivate mit einer PA-Faser Zeiten um 2 h ermittelt [149]. Für unpolare Verbindungen wie PAH und PCB wurden derart lange Äquilibrierungszeiten auch von anderen Autoren berichtet [136, 150, 284].

Mit Korrelationskoeffizienten R^2 zwischen 0,975 und 0,998 wurde für die Regressionskurven eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentellen Werten gefunden. Zudem sind die extrapolierten Äquilibrierungszeiten mit den Resultaten von KELZ für die PA-Faser vereinbar [149].

Da die Zeiten bis zum Erreichen des Gleichgewichts zu lang sind für ein Routineverfahren, wurde für die Methode mit 30 min die Extraktionszeit an die GC angepasst. Wie die Abschätzung zeigt, können so durchschnittlich 37 % der maximalen Substanzmenge extrahiert werden (vgl. Abb. 54). Abgesehen vom Zeitaufwand spricht auch die hohe mechanische Belastung der Faser während der Extraktion gegen lange Äquilibrierungszeiten.

7.4.3 Validierung

7.4.3.1 Reproduzierbarkeit

Zur Beurteilung der Eignung eines Internen Standards wurden 8 Proben untersucht, die die Analyten in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ enthielten. Allen Proben wurde zusätzlich Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ zugesetzt. Nach der Derivatisierung (vgl. Kapitel 7.1.1) wurden die Proben, wie in Kapitel 7.4.2.1 beschrieben, mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser extrahiert und analysiert. Die Auswertung erfolgte mit den in Tab. 35 auf Seite 172 aufgeführten Quantifizierungsionen. Die Peakflächen

Tabelle 38: Reproduzierbarkeit des Verfahrens mit und ohne Internen Standard für verschiedene Matrices.

Analyt	Reproduzierbarkeit /% ^a					
	Reinstwasser ^b		Oberflächenwasser ^c		ASB 3 ^{d,e}	
	mit IS ^e	ohne IS	mit IS ^e	ohne IS	mit IS ^e	ohne IS
Anilin	6,0	14,5	2,9	10,4	13,5	14,5
4AT	4,3	18,5	7,4	14,9	4,4	9,3
4CA	3,8	16,3	4,8	11,4	7,9	12,3
3,4DCA	6,4	17,3	3,0	10,0	9,7	14,5
2,4,5TCA	11,2	14,9	4,4	10,2	8,4	14,2
3C4FA	4,3	16,5	4,7	12,9	6,0	11,6
2,4DAT	11,4	17,2	10,3	10,7	9,8	14,9
2,6DAT	9,2	14,5	7,2	8,7	7,9	13,5
2NaA	7,4	19,9	4,1	10,7	9,7	10,9
2AB	13,8	22,8	5,7	10,1	14,3	17,2
4AB	10,5	9,7	7,3	13,9	12,0	14,7
4NA	19,7	3,7	10,2	4,4	12,4	12,0
2A4NT	16,4	4,3	8,7	3,6	5,1	6,3
2A6NT	14,2	6,2	8,7	5,6	14,7	11,8
4A2NT	16,1	5,0	7,6	4,0	4,2	6,3
2A4,6DNT	20,0	4,2	11,1	6,9	4,0	7,3
4A2,6DNT	13,4	10,3	8,7	6,5	8,1	11,2
2,4DA6NT	15,6	4,5	9,6	8,9	3,6	7,1

^a als Relative Standardabweichung, bestimmt bei einer Analytkonzentration von 0,5 µg/L; ^b n= 8, ^c n= 9 bzw. ^d n= 6 untersuchte Proben; ^e Wasserprobe einer Rüstungsalzlast, belastet mit Nitroaromaten; ^f Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 µg/L.

der ersten 6 Messungen sind für einige ausgewählte Analyten in Abb. 55a dargestellt. Für die Wiederholungsmessungen wurden die Relativen Standardabweichungen (n= 8) berechnet und in Tab. 38 zusammengefasst.

Zum Vergleich wurde die Auswertung mit Anilin-d5 als Internem Standard durchgeführt. Dazu wurden die Peakflächen der Analyten zu der Peakfläche des Internen Standards ins Verhältnis gesetzt. Die relativen Peakflächen sind in Abb. 55b aufgeführt und die Relativen Standardabweichungen den Werten ohne Internen Standard in Tab. 38 gegenübergestellt.

Ohne Internen Standard erhält man bei den nitrosubstituierten Verbindungen gute Resultate mit Relativen Standardabweichungen zwischen 3,7 und 10,3 %. Dagegen ist bei allen Verbindungen ohne Nitrogruppe eine sukzessive Verringerung der Peakflächen zu beobachten (vgl. Abb. 55). Die Relativen Standardabweichungen sind entsprechend hoch. Dieses Verhalten kann durch Verwendung von Anilin-d5 als Interner Standard kompensiert werden. In diesem Fall erhält man auch für diese Verbindungen Relative Standardabweichungen zwischen 3,8 % und 13,8 %, die denen der nitrosubstituierten vergleichbar sind. Für die Derivate mit Nitro-Substituenten ist Anilin-d5 als Interner Standard nicht geeignet. Die Auswertung über den Internen Standard führt hier zu einer deutlichen Verschlechterung der Resultate.

Es gibt mehrere Faktoren, die für die Verringerung der Peakflächen bei den Verbindungen ohne Nitrogruppe in Frage kommen: Ein Verlust an Faserkapazität ist auszuschließen, da sich dieser Faktor auch bei den anderen Analyten bemerkbar machen würde. Zudem wurden bei späteren Derivatisierungen immer wieder Peakflächen erzielt, die sich kaum von den Ausgangswerten unterschieden. Die Alterung der Reagenzien kommt aus diesem Grunde auch nicht als Erklärungsmöglichkeit in Betracht. Sehr wahrscheinlich scheint dagegen ein Zerfall der Derivate zu sein. Zudem werden beispielsweise Iodbenzol und Iodwasserstoffsäure mit Stabilisatoren (Silber, Phosphorige Säure etc.) vertrieben. Es konnten jedoch in keiner Probe entsprechende Zerfallsprodukte identifiziert werden. Gleichzeitig erwiesen sich die Derivate im Essigsäureethylester-Standard über mehrere Wochen als stabil. Der pH-Wert spielt dabei, wie sich im Nachhinein gezeigt hat, eine entscheidende Rolle (vgl. Kap. 7.1.5). Einzig die dabei ablaufende Reaktion bleibt bislang unklar und ist nicht mit den gängigen Reaktionen vereinbar.

Da es sich bei Essigsäureethylester um ein Lösungsmittel mit deutlich geringerer Polarität handelt, wäre es weiterhin möglich, dass die Derivate in wässriger Lösung an den

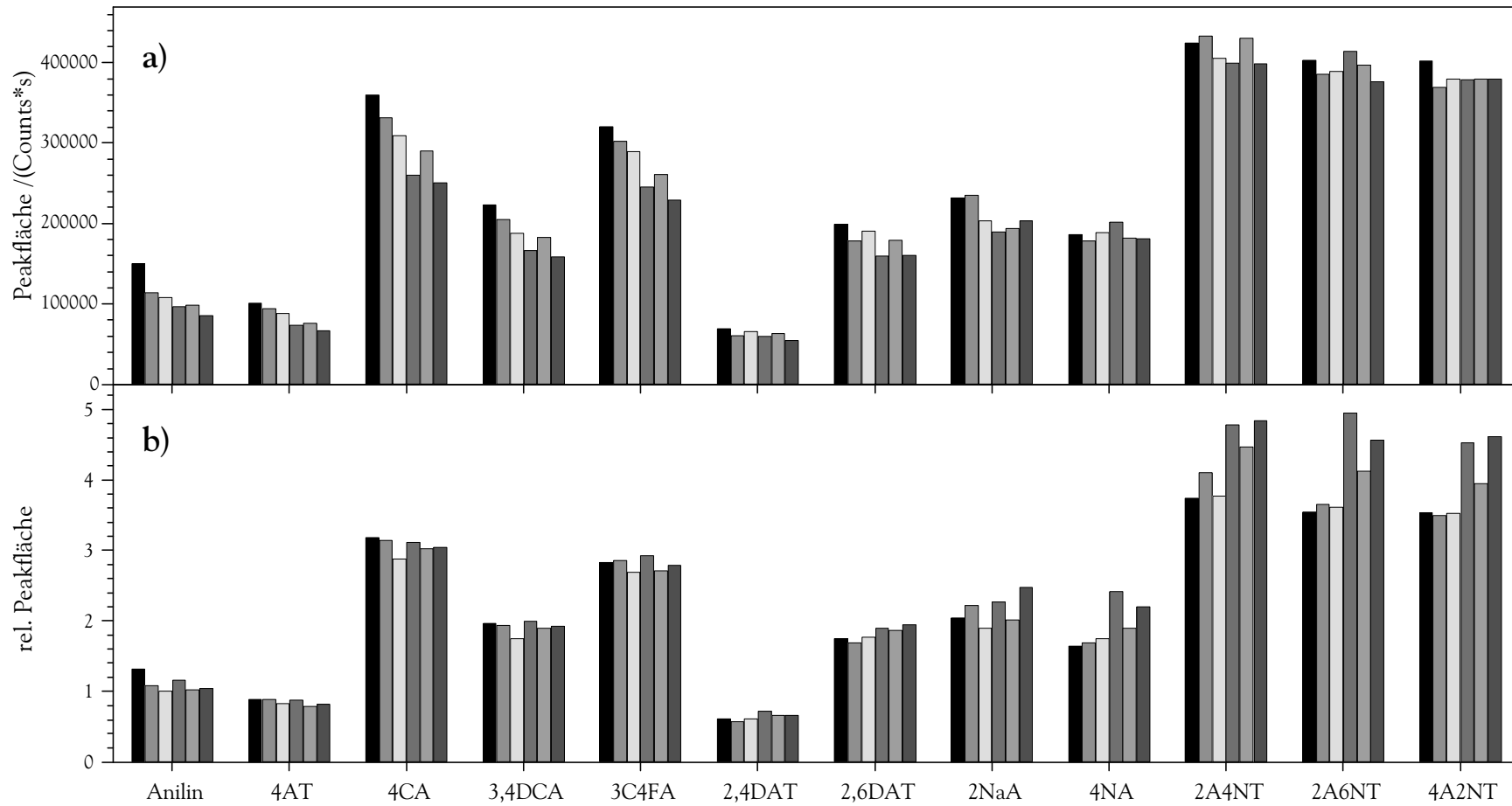


Abbildung 55: Einfluss des Internen Standards. Dargestellt sind die Peakflächen für 6 aufeinanderfolgende Messungen sowie die zugehörigen Relativen Standardabweichungen. Ausgewählt wurden dazu 13 Analyten. Dabei wurde a) ohne Internen Standard und b) mit Anilin-d5 als Internem Standard ausgewertet.

Glaswandungen sorbiert werden. Da die Proben in Acetat-Puffer aber stabil waren, erscheint diese Erklärung unwahrscheinlich.

In Anbetracht der ungewöhnlichen Reaktion sollten die Schlussfolgerungen mit weiteren Experimenten bestätigt und Reaktionsprodukte identifiziert werden.

Da für die folgenden Experimente des Kap. 7.4 am Phosphat-Puffer festgehalten wurde, wurde für alle weiteren Experimente Anilin-d5 als Interner Standard für die Verbindungen ohne Nitrogruppe gewählt. Alle nitrosubstituierten Analyten wurden ohne Internen Standard ausgewertet. Bei diesen Verbindungen wurde auf die Verwendung eines geeigneten Internen Standards verzichtet, da entsprechende markierte Verbindungen sehr teuer sind. Zudem wurde bereits ohne Internen Standard eine gute Reproduzierbarkeit erreicht. Für zukünftige Experimente empfiehlt es sich, statt Phosphat- Acetat-Puffer zu verwenden und sowohl für die nitrosubstituierten, die Diamino-Verbindungen sowie die bicyclischen Amine separate Interne Standards einzuführen.

7.4.3.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Leistungsfähigkeit einer Methode wird in großem Maße bestimmt von ihrer Eignung für unterschiedliche Matrices. Dies gilt insbesondere für SPME, da die Extraktion leicht durch Matrixbestandteile beeinflusst werden kann.

Deshalb wurden unterschiedliche Proben mit den Analyten versehen und die Ergebnisse verglichen. Dazu wurden Reinstwasser, Trinkwasser, Oberflächenwasser aus dem Fluss Ohm bei Großseelheim (die Probenahme erfolgte im Mai 2001) sowie Wasser aus dem Abschöpfbrunnen 3 in Stadtallendorf (Probenahme am 6. Februar 2002) verwendet. Für die Wiederholungsmessungen wurden vom Reinstwasser $n=8$, von Abschöpfbrunnen $n=6$ und vom Trink- und Oberflächenwasser jeweils $n=9$ Proben untersucht. Zu 10 mL der Probe wurden 100 μL des Standards ($\beta=50\text{ }\mu\text{g/L}$, in Wasser) sowie 100 μL des Internen Standards (Anilin-d5, $\beta=50\text{ }\mu\text{g/L}$, in Wasser) gegeben, so dass die Konzentration der Analyten und des Internen Standards in den Proben 0,5 $\mu\text{g/L}$ betrug. Die Derivatisierung wurde, wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Im Anschluss an die 30 minütige direkte Extraktion mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser (vgl. Kapitel 7.4.2.1) erfolgte die Bestimmung mit GC-MS. Für die Auswertung wurden die in

Tabelle 39: Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices mit und ohne Internen Standard. Die Wiederfindungsraten wurden auf Reinstwasser bezogen.

Analyt	Wiederfindungsrate /% ^a					
	Trinkwasser ^b		Oberflächenwasser ^b		ASB 3 ^{c,d}	
	mit IS ^e	ohne IS	mit IS ^e	ohne IS	mit IS ^e	ohne IS
Anilin	119,3	107,4	93,9	84,2	103,3	69,7
4AT	114,6	102,5	93,0	83,0	100,9	68,2
4CA	102,9	94,5	97,6	87,2	100,7	68,2
3,4DCA	106,5	97,6	97,5	87,0	103,1	69,8
2,4,5TCA	118,7	109,6	106,5	95,8	102,6	69,6
3C4FA	103,9	95,4	98,4	88,0	100,9	68,3
2,4DAT	86,9	80,2	77,4	69,2	135,0	91,4
2,6DAT	97,5	89,9	86,6	77,6	121,2	82,1
2NaA	104,5	95,1	90,9	81,0	120,9	81,6
2AB	97,3	89,4	77,1	68,7	127,1	87,6
4AB	115,1	106,4	100,9	91,4	130,6	90,0
4NA	95,3	88,4	99,8	90,8	149,0	100,4
2A4NT	90,4	83,2	94,3	85,5	149,1	100,6
2A6NT	90,6	83,5	89,9	81,3	137,8	92,6
4A2NT	94,1	86,6	96,5	87,5	145,9	98,4
2A4,6DNT	83,8	77,4	96,4	87,8	<i>f</i>	<i>f</i>
4A2,6DNT	85,6	78,5	124,4	112,1	<i>f</i>	<i>f</i>
2,4DA6NT	84,6	77,8	103,7	94,1	159,6	107,8

^a bestimmt bei einer Analytkonzentration von 0,5 µg/L; ^b n= 9; ^c n= 6; ^d Wasserprobe aus dem Abschöpfbrunnen einer Rüstungsalast, belastet mit Nitroaromaten; ^e Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 µg/L; ^f Verbindung in der Probe bereits enthalten.

Tab. 35 auf Seite 172 genannten Quantifizierungsmethoden verwendet. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die mittleren Peakflächen zu den Werten des Reinstwassers in Relation gesetzt. Die Wiederfindungsraten mit und ohne Internen Standard sind in

Tab. 39 und die Relativen Standardabweichungen in Tab. 38 zusammengefasst.

Verglichen mit Reinstwasser bleibt die Reproduzierbarkeit weitgehend erhalten und wird nicht von der Matrix beeinträchtigt. So betragen die Relativen Standardabweichungen der nitrosubstituierten Verbindungen ohne Verwendung eines Internen Standards 5,7 bzw. 8,9 % gegenüber 5,5 % in Reinstwasser. Ebenso verhalten sich die Werte der Verbindungen ohne Nitro-Substituenten bei Verwendung von Anilin-d5 als Internem Standard mit 5,6 bzw. 9,4 % verglichen mit durchschnittlich 8,0 % in Reinstwasser.

Bei den Wiederfindungsraten treten dagegen deutliche Schwankungen auf, die von den Mittelwerten 92,5 % und 106,9 % nur unzureichend wiedergegeben werden. Die Unterschiede bei Betrachtung der einzelnen Analyten sind deutlich größer und die Ergebnisse sind uneinheitlich (vgl. Tab. 39). Mit dem pH-Wert, der Salzkonzentration und dem DOC kommen weitere Variablen hinzu, die das Verhalten eines jeden Analyten individuell beeinflussen. Abgesehen von der Extraktion wird dadurch auch die Derivatisierung beeinflusst, da sich die Amine in der Reaktivität stark unterscheiden. So wurde bereits in Kap. 7.1.4 gezeigt, dass einige Verbindungen wie die Diaminotoluole leicht Nebenreaktionen eingehen. Deshalb kann Anilin-d5 als einziger Interner Standard die verschiedenen Einflüsse nur bedingt kompensieren: Bei Anilin, 4AT, 4CA, 3,4DCA, 2,4,5TCA und 3C4FA ist die strukturelle Verwandtschaft zu Anilin-d5 genügend hoch, so dass die Abweichungen weniger als 20 % betragen. Die Derivate der Diaminotoluole sowie der bicyclischen Verbindungen zeigen ein anderes Verhalten, weshalb sich Matrixeinflüsse mit Anilin-d5 nur unzureichend kompensieren lassen. Dies gilt auch für die nitrosubstituierten Verbindungen, bei denen die Verwendung des Internen Standards besonders bei ASB 3 zu Wiederfindungsraten über 100 % führt. Für diese Verbindungen wurden die besseren Ergebnisse ohne Anilin-d5 als Internen Standard erzielt.

Die Resultate zeigen, dass die Unterscheidung nach Nitrosubstitution hier nicht mehr genügt: Es bedarf weiterer Interner Standards, die den individuellen Strukturmerkmalen der Verbindungen besser gerecht werden. Interessanterweise wurde die Integration der Peaks nicht durch Matrixbestandteile erschwert. Ein Indiz dafür sind auch die verglichen mit Reinstwasser nahezu unveränderten Reproduzierbarkeiten.

7.4.3.3 Einfluss von Reagenzien und SPME-Faser

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, wie groß die Schwankungen von Tag zu Tag sind. Dazu wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 6 Proben untersucht. Diese enthielten die Analyten sowie Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 µg/L. Die Derivatisierung erfolgte für alle Proben in gleicher Weise (vgl. Kapitel 7.1.1). Die Extraktion wurde in allen Fällen mit derselben SPME-Faser durchgeführt (vgl. Kapitel 7.4.2.1). Nach Bestimmung mittels GC-MS wurden die Peakflächen mit den in Tab. 35 auf Seite 172 zusammengefassten Quantifizierungen ausgewertet. Für jede Messreihe wurden die Mittelwerte ($n=6$) gebildet und die Standardabweichungen berechnet. Diese sind in Abb. 56 aufgeführt, wobei die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt sind. Weiterhin wurden die Relativen Standardabweichungen über alle Messungen ($n=18$) bestimmt. Diese sind in Abb. 56 in numerischer Form angegeben. Für alle Analyten wurde die Auswertung sowohl ohne als auch mit Anilin-d5 als Interner Standard durchgeführt. Ebenso wie bereits in Kapitel 7.4.3.1 dargelegt, ist auch hier bei Auswertung ohne Internen Standard eine sukzessive Verringerung der Peakflächen zu beobachten. Der Effekt kann hier jedoch nicht mit einer chemischen Reaktion erklärt werden, da an jedem Tag neu derivatisiert wurde. Der Rückgang der Peakflächen macht sich bei fast allen Analyten bemerkbar, lässt sich aber abgesehen von 2AB und 4AB durch Verwendung des Internen Standards kompensieren. Als Ursache kommen somit lediglich ein allmählicher Verlust an Faserkapazität oder die Alterung der Reagenzien in Betracht.

Um dies zu verifizieren, wurden in einem weiteren Experiment verschiedene SPME-Fasern mit gleicher Beschichtung untersucht. Bei den Fasern handelte es sich um eine neuwertige, um eine bereits für ca. 20 Extraktionen benutzte sowie um eine mehrere Jahre alte PDMS/DVB-Faser. Bei letzterer hatte sich die üblicherweise weiße Beschichtung bereits bräunlich verfärbt.

Am gleichen Tag wurde jede der drei Fasern für die Extraktion von 5 Proben verwendet. Diese enthielten die Analyten sowie Anilin-d5 als Internen Standard in einer Konzentration von 0,5 µg/L. Nach Derivatisierung gemäß Kapitel 7.1.1 wurden die Proben 30 min mit den PDMS/DVB-Fasern extrahiert. Diese wurden vor Beginn jeder Messreihe gemäß den Herstellerangaben konditioniert. Die Auswertung erfolgte nach Bestimmung mit GC-

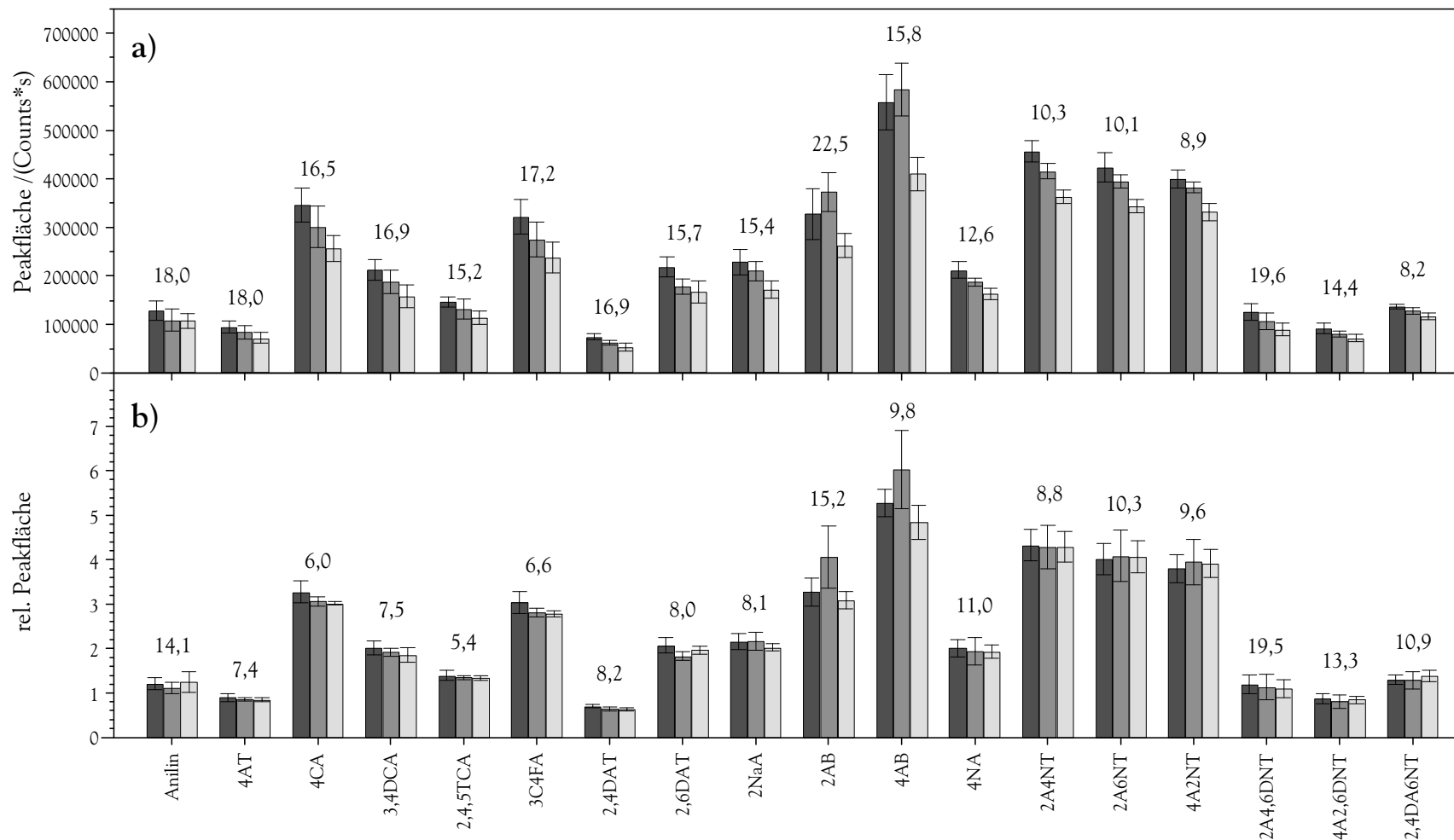


Abbildung 56: Day-to-day-Reproduzierbarkeit. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 6 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n=6$) a) ohne Internen Standard und b) mit Anilin-d5 als Interner Standard. Als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der einzelnen Messreihen dargestellt. Die Zahlenwerte geben die Relativen Standardabweichungen über alle Messungen wieder ($n=18$).

MS mit Hilfe der in Tab. 35 auf Seite 172 genannten Quantifizierungen. Alle Analyten wurden sowohl ohne als auch mit Anilin-d5 als Internem Standard ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte jeder Messreihe gebildet und zusammen mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken in Abb. 57 dargestellt. Die Relativen Standardabweichungen über alle Messungen sind als Zahlenwerte über den Balken in Abb. 57 abgedruckt.

Nach Anreicherung an der neuen Faser wurden bei der überwiegenden Zahl der Analyten größere Peakflächen gefunden als nach Extraktion mit der benutzten. Die durchschnittliche Zunahme beträgt 10,6 %. Die Ergebnisse sind in Abb. 57 in der Reihenfolge dargestellt, in der sie gemessen wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die SPME-Fasern mit der Zeit verändern und an Kapazität verlieren. Die Unterschiede zwischen den Fasern sind aber gering und können durch Verwendung eines geeigneten Internen Standards kompensiert werden (vgl. Abb. 57). Trotz optischer Veränderung ist die alte Faser gleichermaßen geeignet. Die Lebensdauer einer SPME-Faser wird demzufolge nicht nur durch die plötzliche Ablösung der Beschichtung oder das Abbrechen der Faser begrenzt, sondern auch durch einen allmählichen Verlust an Faserkapazität. Dieser geht jedoch vergleichsweise langsam vor sich, bedenkt man, dass die benutzte Faser bereits ca. 20x verwendet wurde. Selbst die Alterung infolge mehrjähriger Lagerung spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Die überdurchschnittlich hohen Relativen Standardabweichungen bei 2A4,6DNT und 4A2,6DNT sind wahrscheinlich auf Störungen des pH-Werts zurückzuführen, da unter stärker basischen Bedingungen die Dinitroaromaten nucleophil substituiert werden können [330, 331].

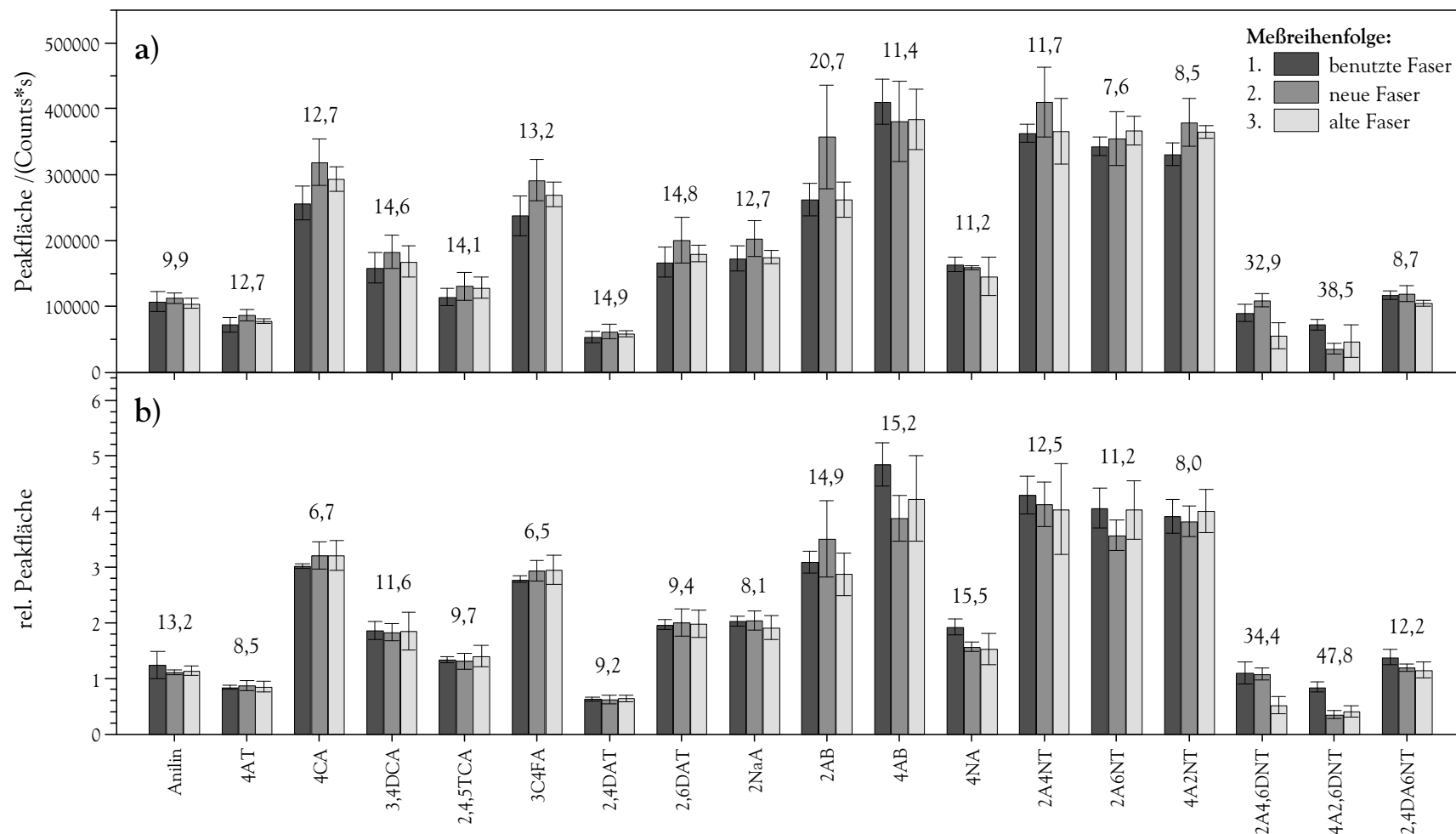


Abbildung 57: Vergleich verschiedener Fasern mit gleicher Beschichtung. Mit drei unterschiedlich häufig verwendeten PDMS/DVB-Fasern wurden jeweils 5 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n=5$) a) ohne Internen Standard und b) mit Anilin- d_5 als Interner Standard. Als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der einzelnen Messreihen dargestellt. Die Zahlenwerte geben die Relativen Standardabweichungen über alle Messungen wieder ($n=15$).

7.4.3.4 Verschleppung

Es wurde untersucht, ob ein Verschleppungseffekt auftritt, wie er bereits bei aliphatischen Iodiden beobachtet worden war [328]. Dazu wurden wiederholt Proben untersucht, die die Analyten in einer Konzentration von 1 µg/L enthielten. Eine vergleichsweise hohe Konzentration wurde gewählt, um auch geringe Verschleppungen ausreichend empfindlich detektieren zu können. Nach 30minütiger Extraktion mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser (vgl. Kapitel 7.4.2.1) wurden die Analyten 5 min im Injektorblock des GC desorbiert. Im Anschluss an die Bestimmung mit GC-MS erfolgte eine zweite 5minütige Desorption ohne vorangehende Anreicherung.

Die beobachteten Peakflächen wurden zu denen der ersten Desorption ins Verhältnis gesetzt und so das Maß an Verschleppung bestimmt. Für alle Analyten wurde weniger als 1 % Verschleppung beobachtet. Die bei den aliphatischen Iodiden beobachtete Verschleppung [328] konnte für die aromatischen Verbindungen nicht bestätigt werden und ist vermutlich auf die unterschiedlichen Messbedingungen zurückzuführen.

7.4.3.5 Kalibrierung der Methode

Die Kalibrierung wurde über die gesamte Methode durchgeführt. Dies schließt neben Trennung und Detektion mittels GC-MS auch die Derivatisierung und die Anreicherung durch SPME ein. Es wurde im Bereich von 50 bis 5000 ng/L in Reinstwasser kalibriert. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen betragen 50, 100, 500, 1000 und 5000 ng/L. Von jeder Konzentration wurden drei Proben hergestellt und bestimmt.

Für die Messungen wurden je 10 mL Reinstwasser mit 100 µL des Standards ($\beta = 1$ bis 500 µg/L, in Wasser) versetzt. Auf diese Weise ist der Methanolgehalt in den Proben mit 0,1 % gering und in allen Proben gleich. Dadurch werden Extraktion und Derivatisierung (vgl. Kapitel 7.1.4) kaum beeinflusst und die Unterschiede zwischen Standard- und Realprobe werden gering gehalten. Anschließend wurden 100 µL des Internen Standards (Anilin-d5, $\beta = 500$ µg/L, in Wasser) zugegeben und die Lösungen wie unter Kapitel 7.1.1 beschrieben derivatisiert. Die Proben wurden mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser

Tabelle 40: Kalibrierung des in-situ Derivatisierung-SPME-GC-MS- Verfahrens. Angegeben sind die Steigung b und der Achsenabschnitt a der Kalibriergeraden sowie die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , der Verfahrensvariationskoeffizient V_{x0} und der Korrelationskoeffizient R .

Analyt	b^a	a^a	s_{x0}	V_{x0}	R^2	
	/ $\frac{\text{Counts}\cdot\text{s}}{(\text{ng/L})}$	/ $(\text{Counts}\cdot\text{s})$	/ (ng/L)	/ %		
Anilin	0,00200	0,4674	101,60	7,6	0,9974	^b
4AT	0,00179	0,0881	59,75	4,5	0,9991	^b
4CA	0,00597	0,0520	49,22	3,7	0,9994	^b
3,4DCA	0,00448	0,0357	69,45	5,2	0,9988	^b
2,4,5TCA	0,00251	0,0263	66,44	5,0	0,9989	^b
3C4FA	0,00535	0,1482	55,80	4,2	0,9992	^b
2,4DAT	0,00127	0,1277	144,58	13,5	0,9934	^b
2,6DAT	0,00380	0,2258	83,90	7,9	0,9978	^b
2NaA	0,00569	-0,0049	101,73	7,6	0,9974	^b
2AB	0,00874	0,4442	229,18	17,2	0,9871	^b
4AB	0,01344	0,2204	85,87	6,5	0,9982	^b
4NA	232,21	-7837	255,99	19,2	0,9840	^c
2A4NT	426,09	3489	229,88	17,3	0,9870	^c
2A6NT	382,03	4933	221,69	16,7	0,9879	^c
4A2NT	369,82	4610	242,95	18,3	0,9855	^c
2A4,6DNT	166,54	-2122	185,52	13,9	0,9915	^c
4A2,6DNT	89,52	364	175,40	13,2	0,9924	^c
2,4DA6NT	163,42	69	146,41	11,0	0,9947	^c

^a bei Verwendung des Internen Standards ist die Steigung b in (L/ng) angegeben, der Achsenabschnitt a ist dimensionslos; ^b mit Anilin-d5 ($\beta = 0,5 \mu\text{g/L}$) bzw. ^c ohne Internen Standard; Kalibrierung mit $n = 15$ Werten im Bereich von 50 ng/L bis 5000 ng/L.

30 min extrahiert (vgl. Kapitel 7.4.2.1) und mittels GC-MS chromatographiert und detektiert.

Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen mit den in Tab. 35 auf Seite 172 aufgeführ-

ten Quantifizierungen. Bei den nitrosubstituierten Analyten wurde die Kalibrierung ohne Internen Standard durchgeführt. Für alle anderen Analyten wurde Anilin-d5 als Interner Standard verwendet, das in allen Proben in einer Konzentration von 500 ng/L vorlag. Während bei den nitrosubstituierten Verbindungen die Peakfläche gegen die Konzentration der Analyten aufgetragen wurde, wurde hier die relative Peakfläche verwendet. Dabei handelt es sich um das Verhältnis der Peakfläche des Analyten zu der des Internen Standards. Die Datenpaare wurden einer linearen Regression unterzogen. Die Steigung b und der Achsenabschnitt a der Ausgleichsgeraden sind in Tab. 40 zusammen mit der Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} dargestellt. Zur Beurteilung der Methode wurden der Korrelationskoeffizient R und der Verfahrensvariationskoeffizient V_{x_0} herangezogen.

Der Kalibrierbereich orientierte sich an den Vorgaben der Trinkwasserverordnung, die für Pestizide und deren Metaboliten, zu denen auch aromatische Amine zählen, einen Grenzwert von 100 ng/L vorsieht [332]. Die Konzentrationen zwischen 50 und 5000 ng/L decken einen Bereich von 2 Zehnerpotenzen ab.

Die Korrelationskoeffizienten R^2 liegen im Bereich zwischen 0,9840 und 0,9994. Die Variationskoeffizienten sind bei Auswertung mit Internem Standard deutlich geringer: Während sie im ersteren Fall durchschnittlich nur 7,5 % betragen, wurden ohne Internen Standard im Mittel 15,7 % beobachtet. Gegenüber anderen Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine nach SPME sind die Ergebnisse vergleichbar [205–207]. Die Derivatisierung hat keinen negativen Einfluss auf die Qualität der Kalibrierung.

7.4.3.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt. Dazu wurden 9 Lösungen hergestellt, die die Analyten sowie Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ enthielten. Weiterhin wurden 2 Blindproben verwendet, die lediglich Anilin-d5 in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ enthielten. Die Derivatisierung wurde wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben durchgeführt. Nach Extraktion mit einer PDMS/DVB-Faser (vgl. Kapitel 7.4.2.1) wurden die Analyten mittels GC-MS bestimmt.

Die Signalintensität, das Rauschen und das S/N-Verhältnis wurde mit Hilfe der Software „Saturn View“ Version 5.41 (Fa. Varian) ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte der 9 Messungen gebildet und gemäß KROMIDAS [333] auf ein S/N von 3 (Nachweisgrenze)

Tabelle 41: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des in-situ Derivatisierung-SPME-GC-MS- Verfahrens mit direkter Extraktion, berechnet anhand der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse.

Analyt	Nachweisgrenze ^a	Bestimmungsgrenze ^b
	/(ng/L)	/(ng/L)
Anilin	4	13
4AT	12	39
4CA	2	7
3,4DCA	3	11
2,4,5TCA	6	19
3C4FA	3	9
2,4DAT	13	43
2,6DAT	7	24
2NaA	11	36
2AB	5	16
4AB	9	29
4NA	5	17
2A4NT	8	25
2A6NT	2	7
4A2NT	3	9
2A4,6DNT	38	126
4A2,6DNT	27	91
2,4DA6NT	30	99

berechnet für ^a S/N= 3 bzw. ^b S/N= 10; Ausgangskonzentration 0,5 µg/L, 10 mL Probevolumen, n= 9 Proben.

bzw. 10 (Bestimmungsgrenze) extrapoliert.

Die so ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tab. 41 aufgeführt. Die Nachweisgrenzen liegen mit Werten zwischen 2 und 13 ng/L im unteren ng/L-Bereich. Lediglich die Nachweisgrenzen von 2A4,6DNT, 4A2,6DNT sowie 2,4DA6NT heben sich mit Nachweisgrenzen von 38 ng/L, 27 ng/L bzw. 30 ng/L von den übrigen Resultaten ab. Dies ist weniger auf eine geringere Signalintensität sondern vielmehr auf ein höheres Rauschen infolge des mit der Temperatur zunehmenden Säulenblutens zurückzuführen. Die Empfindlichkeit bei den spät eluierenden Derivaten lässt sich durch MS/MS-Detektion

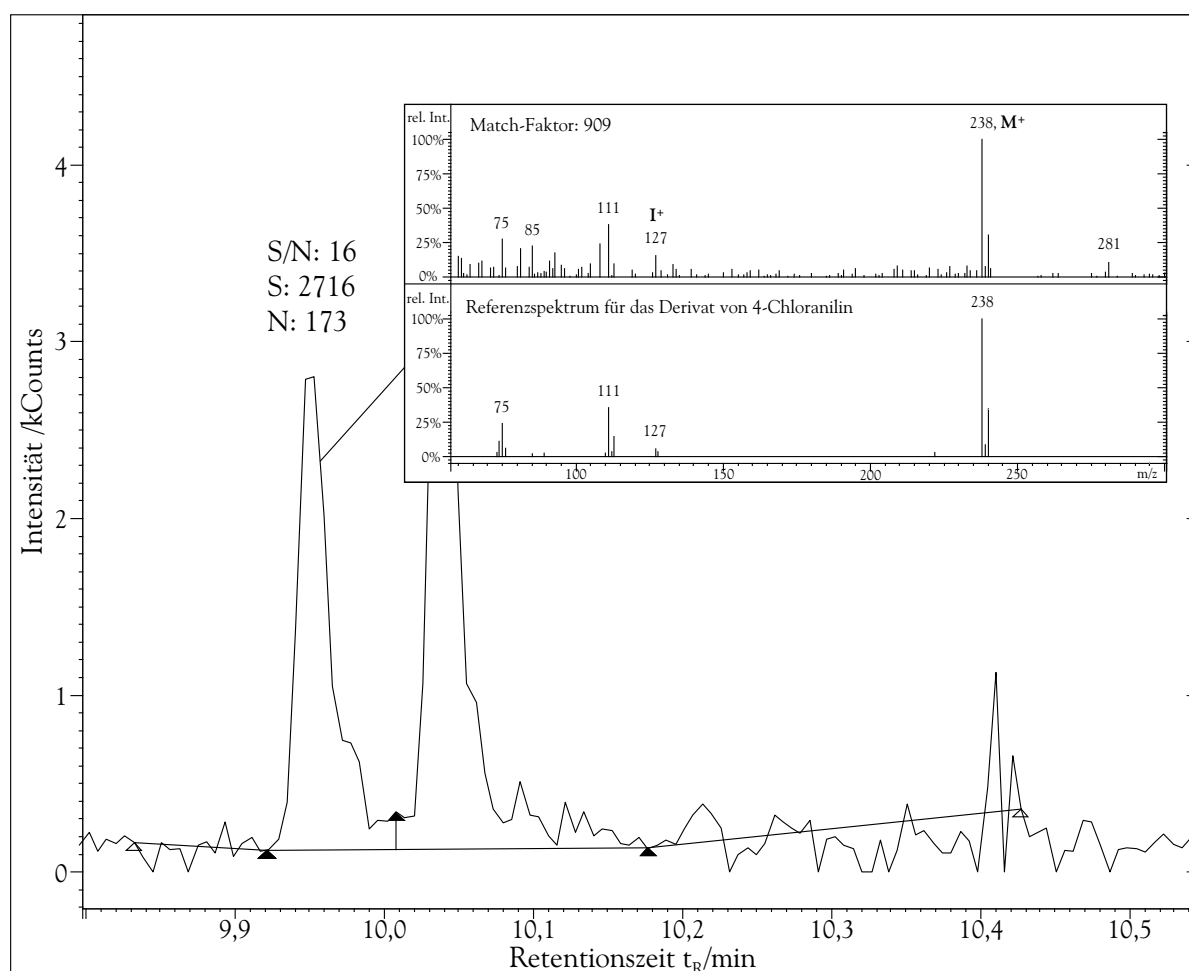


Abbildung 58: Chromatogramm des Derivats von 4-Chloranilin bei einer Konzentration von 10 ng/L nach Anreicherung mit SPME (vgl. Kapitel 7.4.2.1). Dargestellt ist die Massenspur 238. Neben dem Massenspektrum im Peakmaximum ist das Referenzspektrum abgebildet.

und Ausblendung des Rauschens auf das Niveau der anderen verbessern.

Da die Software für das Rauschen einen Wert neben dem Peakmaximum wählte, wurden die Werte für das Rauschen anhand zweier Blindproben überprüft. Mit diesen wurde das Rauschen im Peakmaximum bestimmt und eine gute Übereinstimmung mit den in Tab. 41 beschriebenen Resultaten beobachtet. Zum Vergleich wurden Proben untersucht, die die Analyten in einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze enthielten. Dazu wurden die S/N-Verhältnisse bei einer Konzentration von 10 ng/L anhand dreier Proben bestimmt. Die Ergebnisse stützen die zuvor bestimmten Nachweisgrenzen (vgl. Tab. 41). Bereits bei 10 ng/L findet man eine gute Übereinstimmung der Massenspektren mit den Referenzspektren. So wurde für das Derivat von 4CA ein Match-Faktor von 909 ermittelt (vgl. Abb. 58). Neben dem Molpeak, bei dem auch der Isotopenpeak von ^{37}Cl deutlich zu erkennen ist, ist auch die charakteristische Iod-Spur 127 und ein $[\text{M}-127]^+$ -Signal vorhanden. Zum Vergleich ist das Referenzspektrum dargestellt, das bei einer aufgegebenen Stoffmenge von 5 ng aufgezeichnet wurde.

7.4.4 Untersuchung von Realproben

Es wurden verschiedene Realproben aus Stadtallendorf (Hessen) untersucht. Es handelte sich dabei um Proben der Pumpstation P2 und des Abschöpfbrunnens ASB3. Die Probenahme erfolgte am 6. Februar 2002. Weiterhin wurde eine Probe des Tiefbrunnens S16 in Stadtallendorf untersucht, die bereits am 7. Mai 2001 genommen wurde.

Von allen Proben standen 2 L zur Verfügung, die in Braunglasflaschen bei 4°C aufbewahrt wurden. Die pH-Werte der Proben lagen zwischen 5 und 5,5. Die Probe P2 war schwach gelb gefärbt vermutlich aufgrund einer starken Belastung mit Nitroaromaten.

Für die quantitative Analyse wurden von den Realproben ASB3 und P2 jeweils $n=5$ Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Probe S16 wurde nur einmal untersucht. Die Bestimmung erfolgte durch externe Kalibrierung. Dazu wurden zusammen mit den Proben 4 Kalibrierstandards verwendet, die einen Bereich von 0,1 bis 5 $\mu\text{g/L}$ abdeckten. Für die Realproben wie die Proben zur Kalibrierung wurde ein einheitliches Volumen von 10 mL gewählt. Die Kalibrierproben wurden wie in Kap. 7.4.3.5 hergestellt.

Tabelle 42: In Wasserproben der Rüstungsalzlast Stadallendorf über in-situ Derivatisierung-SPME-GC-MS bestimmte aromatische Amine. Angegeben sind die Mittelwerte der durch externe Kalibrierung bestimmten Konzentrationen sowie die Relativen Standardabweichungen.

Analyt	ASB 3 ^a		P 2 ^b	
	c /($\mu\text{g/L}$)	(RSD)	c /($\mu\text{g/L}$)	(RSD)
Anilin	n.n.		n.	
4AT	n.n.		0,25	(9,0)
4CA	n.n.		n.	
3C4FA	n.n.		n.	
2,4DAT	n.n.		n.	
2,6DAT	n.n.		n.	
4NA	n.n.		0,27	(10,4)
2A4NT	n.		0,61	(3,0)
2A6NT	n.		1,32	(4,9)
4A2NT	n.		1,40	(5,9)
2A4,6DNT	2,22	(5,1)	6,41	(2,6)
4A2,6DNT	4,44	(6,0)	14,5	(4,4)
2,4DA6NT	n.		0,24	(18,6)

^a n= 4 bzw. ^b n= 5 Proben; kalibriert mit 4 Proben im Bereich 0,1 bis 5 $\mu\text{g/L}$; n. - nachgewiesen, außerhalb des Kalibrierbereichs; n.n. - nicht nachgewiesen.

Alle Proben wurden mit 100 μL des Internen Standards (Anilin-d5, $\beta= 50 \mu\text{g/L}$, in Wasser) versehen und wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben derivatisiert. Anschließend wurden nach 30minütiger Extraktion mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser (vgl. Kapitel 7.4.2.1) die Derivate mittels GC-MS bestimmt. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen unter Verwendung der in Tab. 35 auf Seite 172 genannten Quantifizierungsfunktionen. In gleicher Weise wie in Kap. 7.4.3.5 wurde eine Ausgleichsgerade bestimmt. Anhand der Geradengleichung wurden die Konzentrationen der Analyten in den Realproben berech-

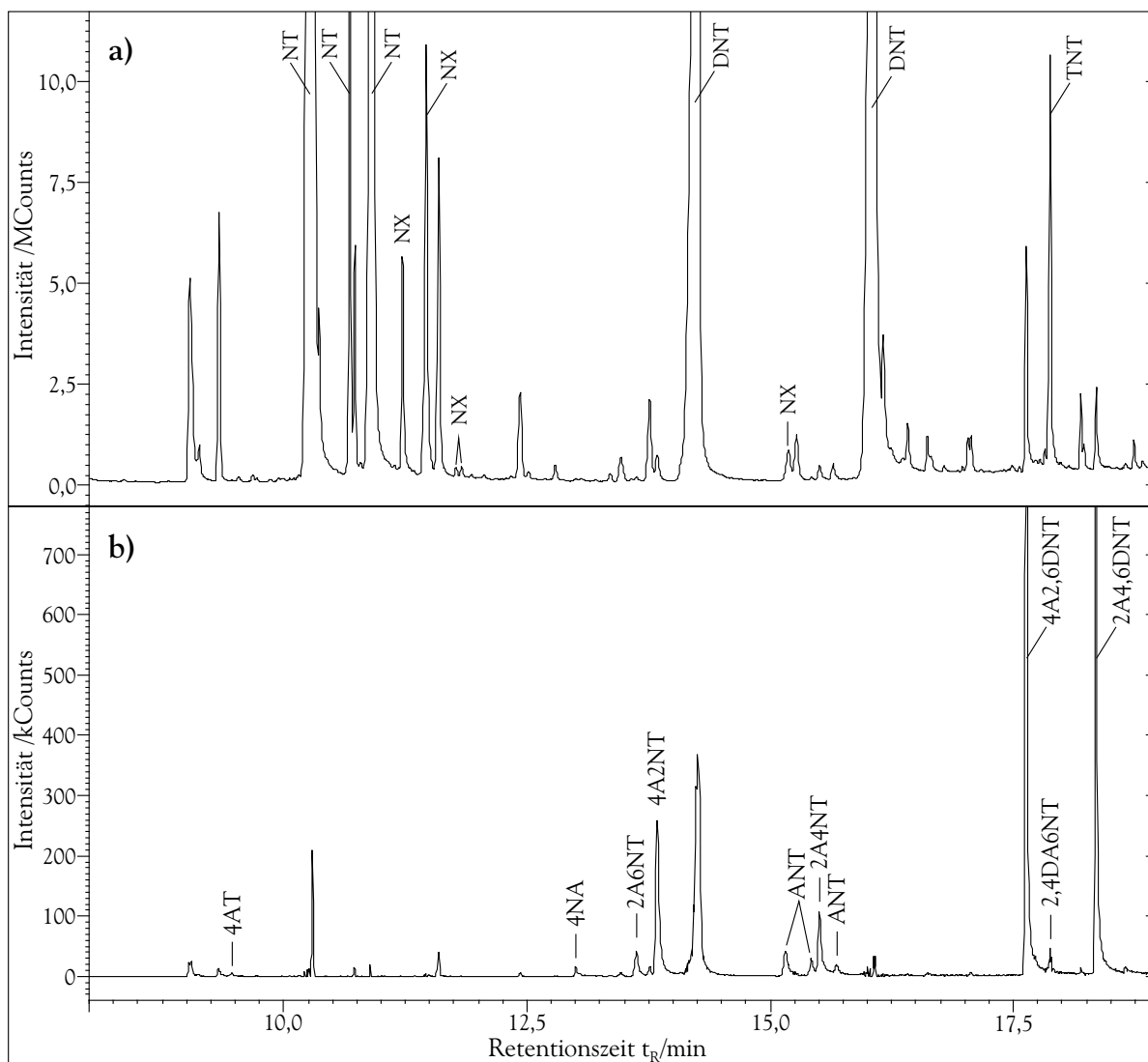


Abbildung 59: Chromatogramm einer stark belasteten Probe (Pumpstation P2). Dargestellt sind a) der Totalionenstrom und b) ausgewählte Einzelmassenspektren (218+246+249+263+291+372) entsprechend der nachgewiesenen Verbindungen (vgl. Tab. 42). Identifiziert wurden außerdem die 3 isomeren Nitrotoluole NT, 5 Isomere des Nitroxyls NX, 2 Dinitrotoluole DNT, Trinitrotoluol TNT sowie 3 weitere Isomere des Aminonitrotoluols ANT.

net. Bei allen nitrosubstituierten Verbindungen erfolgte die Bestimmung ohne Anilin-d5 als Internen Standard, da sich dieser bei Reproduzierbarkeit und Wiederfindung als nachteilig erwies (vgl. Kap. 7.4.3.1 und 7.4.3.2). Tab. 42 enthält neben den Mittelwerten die Relativen Standardabweichungen ($n=5$) der Konzentrationen der Analyten.

In der Probe P2 wurden Anilin, 4CA, 3C4FA, 2,4DAT und 2,6DAT nachgewiesen, deren Konzentration unterhalb des Kalibrierbereichs lag. Trotz geringer Konzentration ist das Auftreten von 4CA und 3C4FA überraschend, da sie keine Abbauprodukte von Nitroaromaten sind. Die Derivate konnten sicher anhand der Massenspektren und der Retentionszeiten identifiziert werden. Da die Verbindungen in allen 5 nacheinander untersuchten Proben auftraten, kann von einer Verschleppung abgesehen werden. Darüber hinaus konnten weitere drei Aminonitrotoluole ANT identifiziert werden, die nicht zu den untersuchten Verbindungen gehören (vgl. Abb. 59). Daneben wurden die 3 isomeren Nitrotoluole NT, 2 Dinitrotoluole DNT und Trinitrotoluol TNT in sehr hoher Konzentration gefunden. In weniger hohen Konzentrationen konnten 5 isomere Nitroxylole NX nachgewiesen werden (vgl. Abb. 59). Bei P2 wurden im Fall von 2A4,6DNT und

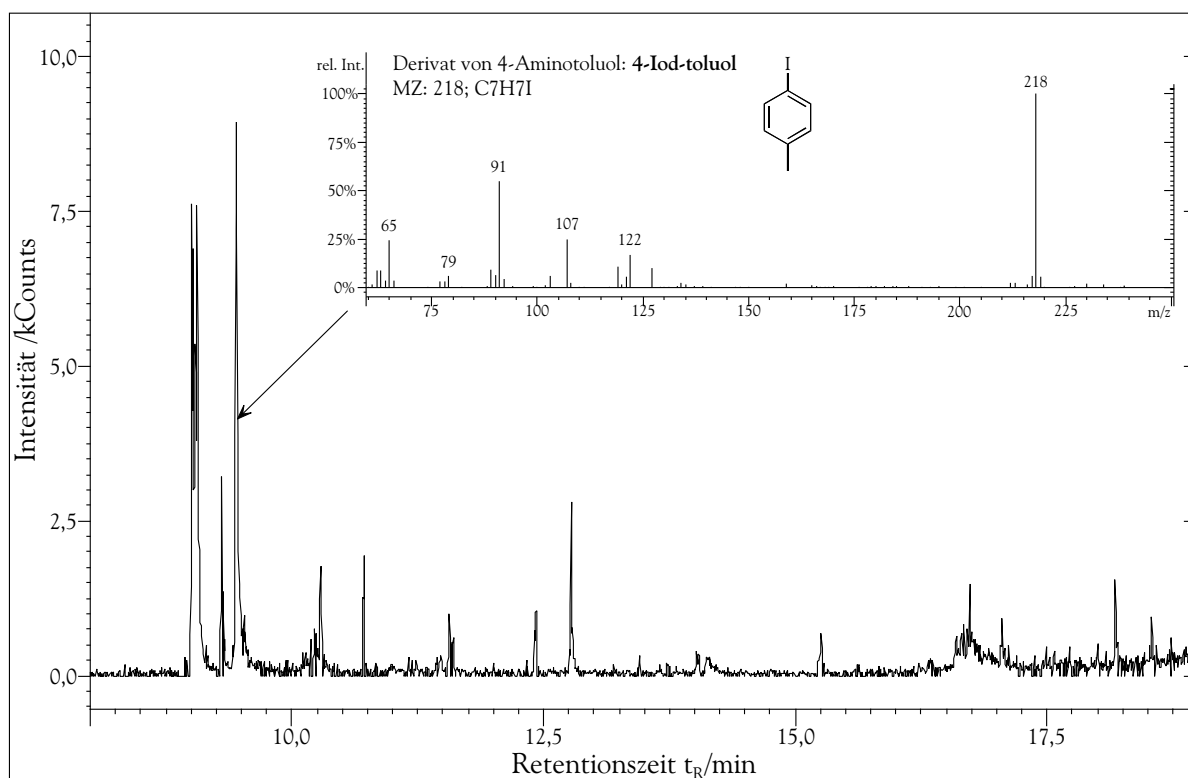


Abbildung 60: Chromatogramm der Probe aus dem Tiefbrunnen S16 in Stadtallendorf. Dargestellt ist die Einzelmassenspur 218 des Derivats von 4-Aminotoluol, das in einer Konzentration von $0,24 \mu\text{g/L}$ bestimmt wurde. Das gezeigte Massenspektrum gestattet eine sichere Identifizierung der Verbindung (vgl. Kap. 12.1).

4A2,6DNT die Konzentrationen nur abgeschätzt, da die Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs lagen. Die hohen Relativen Standardabweichungen bei 2,4DA6NT sind auf den störenden Einfluss von Trinitrotoluol zurückzuführen, das mit diesem koeluiert (vgl. Abb. 59).

In der Probe S16 konnte 4AT in einer Konzentration von 0,24 µg/L nachgewiesen werden. Abb. 60 zeigt das Chromatogramm der Probe anhand der Einzelmassenspur 218 sowie das Massenspektrum der identifizierten Verbindung im Peakmaximum.

7.4.5 Vergleich mit Standardaddition

Die in den Wasserproben der Rüstungsalzlast Elsnig nachgewiesenen aromatischen Amine (vgl. Tab. 26 auf Seite 126) sollten quantifiziert werden. Dazu wurde zunächst ein Standard hergestellt, der die 17 in Tab. 25 auf Seite 123 aufgeführten Analyten in einer Konzentration von 10 mg/L enthielt. Da die Konzentration der Aminodinitrotoluole in den Realproben gewöhnlich deutlich höher ist, wurden sie in zehnfach höherer Konzentration zugegeben. Durch Verdünnung wurden für die Kalibrierung Proben mit einem Volumen von 10 mL hergestellt, die die Analyten abgesehen von 2A4,6DNT und 4A2,6DNT in Konzentrationen von 0,2 bis 10 µg/L enthielten (vgl. Kapitel 10.3.3). Ebenso wurden auch von jeder Realprobe 10 mL verwendet.

Standards und Realproben wurden mit 3C4FA als Internem Standard ($\beta = 2,5$ µg/L in den Proben) versetzt und in gleicher Weise derivatisiert (vgl. Kap. 7.1.1) und extrahiert. Beginnend mit den Kalibrierlösungen in aufsteigender Konzentration wurden die Proben unter Rühren jeweils 30 min bei Raumtemperatur mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser manuell extrahiert. Die Extraktion erfolgte direkt aus der Probe (direct-SPME). Die angereicherten Derivate wurden mit GC-AED wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben über die Iod-Spur I183 bestimmt. Die Chromatogramme der Realproben sind im Anhang (vgl. Seite 275ff) abgedruckt. Zur Auswertung wurden die Peakflächen auf den Internen Standard bezogen und die Ausgleichsgeraden bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen in den Realproben anhand der Daten der linearen Regression berechnet und in Tab. 43 zusammengefasst.

Tabelle 43: Übersicht über die in Wasserproben der Rüstungsalzlast Elsnig gefundenen aromatischen Amine, die mittels externer Kalibrierung bzw. Standardaddition (in Klammern) bestimmt wurden.

Analyt	Konzentration /($\mu\text{g/L}$) ^d							
	Rohwasser ^{a,b}		Rohwasser ^{a,b}		Rohwasser ^{a,b}		Rohwasser MF ^{a,c}	
	227 - 110 - 00	UTT Probe 2	UTT 08 10 2003	UTT 08 10 2003	UTT 08 10 2003	HGN 08 10 2003	HGN 08 10 2003	
4AT	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	1,02	(0,67)
1,3DAB	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	0,59	(0,21)	0,75	(1,65)
3NA	2,17	(2,40)	1,07	(1,18)	0,39	(0,61)	n.n.	(n.n.)
3,5DNA	8,40	(10,6)	8,16	(6,07)	3,46	(2,61)	n.n.	(n.n.)
2A3NT	1,31	(2,37)	1,11	(0,85)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)
2A4NT	0,35	(0,38)	0,71	(0,44)	0,26	(0,27)	n.n.	(n.n.)
2A5NT	0,68	(0,66)	0,62	(0,51)	0,18	(0,33)	n.n.	(n.n.)
2A6NT	8,55	(9,09)	7,43	(6,22)	2,86	(3,00)	0,53	(0,57)
4A2NT	9,51	(12,0)	4,51	(4,52)	3,28	(1,86)	0,75	(0,88)
4A3NT	n.n.	(n.n.)	0,40	(0,44)	0,02	(0,27)	n.n.	(n.n.)
2A4,6DNT	29,3	(32,4)	33,0	(24,0)	12,6	(11,0)	1,92	(2,18)
4A2,6DNT	55,5	(56,7)	60,3	(49,9)	28,8	(25,5)	5,93	(4,30)
2,4DA6NT	0,96	(1,68)	0,58	(1,20)	0,22	(0,57)	n.n.	(n.n.)
2,6DA4NT	1,50	(2,94)	1,30	(1,43)	0,63	(0,63)	n.n.	(n.n.)

^a Externe Kalibrierung im Bereich 0,2 - 10 $\mu\text{g/L}$ (2,0 - 100 $\mu\text{g/L}$ bei ADNT's) mit 3C4FA als IS; ^b Standardaddition von 5 - 50 ng der Analyten (2A6NT, 4A2NT und 3,5DNA: 10 - 100 ng; 2A4,6DNT: 25 - 250 ng; 4A2,6DNT: 50 - 500 ng) und 3C4FA als IS; ^c Standardaddition von 2 - 10 ng der Analyten (2A6NT, 4A2NT und 3,5DNA: 5 - 50 ng; 2A4,6DNT: 5 - 50 ng; 4A2,6DNT: 10 - 100 ng) und 3C4FA als IS; ^d n.n. - nicht nachgewiesen.

Zum Vergleich wurden die Analytkonzentrationen auch durch Standardaddition bestimmt. Dazu wurden von jeder Wasserprobe vier 10 mL Aliquote entnommen. Während eines unbehandelt blieb, wurden den übrigen die Analyten in unterschiedlicher Menge zugesetzt. Dabei wurde das zugegebene Volumen mit 100 μL konstant gehalten und die

Analytmengen an die Ergebnisse der Externen Kalibrierung angepasst. Dazu wurden zuvor verschiedene Standards hergestellt, die den Konzentrationsverhältnissen in den Proben nahe kamen (vgl. Tab. 43). Je nach Konzentration in der Probe wurden 3 der 4 Standards zugegeben. Da sich die Konzentrationsverhältnisse in den untersuchten Proben gleichen, genügten 4 Standards, von denen je 3 für eine Probe verwendet wurden. Vor der Derivatisierung wurde jeder Probe 3C4FA als Interner Standard in einer Konzentration von 2,5 µg/L zugesetzt. Die Analyten wurden derivatisiert und die Verbindungen wie oben durch manuelle Extraktion mit einer 65 µm PDMS/DVB-Faser unter Rühren für 30 min angereichert. Die Bestimmung erfolgte anschließend mit GC-AED über die Iod-Spur I183. Auch hier erwies sich die Verwendung des Internen Standards als vorteilhaft. Durch Vergleich der relativen Peakflächen der Proben mit bzw. ohne Dotierung wurden die in Tab. 43 aufgeführten Konzentrationen bestimmt.

Es findet sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Externen Kalibrierung mit einer durchschnittlichen Abweichung von 31 %. Im Mittel über alle Ergebnisse ist kein Trend zu Mehr- oder Minderbefunden erkennbar. Tendenziell sind mit abnehmender Analytkonzentration zunehmende Differenzen zu beobachten. Bei der Beurteilung muss berücksichtigt werden, dass der Konzentrationsbereich bei der Standardaddition deutlich kleiner und bereits an die Verhältnisse in den Proben angepasst war. Weiterhin genügt bereits die Verwendung eines Internen Standards für alle Analyten, um auch für manuelle SPME sehr gute Ergebnisse zu erzielen. Schwankungen durch eine weniger präzise Extraktion konnten so vermindert werden. Wie die gute Übereinstimmung zwischen Externer Kalibrierung und Standardaddition zeigt, kann durch Verwendung des Internen Standards gleichfalls der Matrixeinfluss minimiert werden.

8 Diskussion

8.1 Derivatisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine in-situ Derivatisierung für aromatische Amine vorgestellt. Ausgehend von den Vorarbeiten von KELZ wurde die Derivatisierung an die darauf folgende Festphasenmikroextraktion (SPME) angepasst [149]. Die aromatischen Amine wurden dazu direkt in wässriger Lösung diazotiert und durch Umsetzung mit Iodid in aromatische Iodide umgewandelt. Auf diese Weise ließen sich in weniger als 3 h etwa 30 Proben derivatisieren. Während die Umsetzung von Hand durchgeführt werden musste, konnte die Bestimmung mit SPME-GC-MS routinemäßig mit einem Autosampler durchgeführt werden.

So ließ sich eine Vielzahl aromatischer Amine derivatisieren. Die verwendeten Analyten orientierten sich an den bislang untersuchten Verbindungen und deckten einen weiten Bereich primärer aromatischer Amine und Diamine ab. Mit der Derivatisierung von alkylierten und halogenierten aromatischen Aminen sowie Aminobiphenylen und Naphthylaminen war das Verfahren für alle Aniline geeignet, die üblicherweise nach Derivatisierung erfasst werden. Darüber hinaus ließen sich auch desaktivierte Verbindungen wie Dinitroaniline und Dianiline mit guten Stoffumsätzen überführen. In weiteren Untersuchungen ist das Verhalten von Aminophenolen bei der Derivatisierung zu prüfen, da einzelne als Abbauprodukte im Urin gefunden wurden. Ebenso ließe sich das Verfahren mit Aminobenzoesäuren auf amphotere Verbindungen ausdehnen, die bereits von REITERMAYER, PETERSMANN und VOLKWEIN zu Azofarbstoffen gekuppelt wurden [268–270]. Wenig bekannt ist über die Eignung des Verfahrens für heteroaromatische Amine, obgleich Aminopyridine vereinzelt auch im Urin gefunden wurden.

Die Eignung der Derivatisierung für bestimmte Verbindungen lässt sich exakt nur über die Reaktionsausbeuten beurteilen. Da es dazu der entsprechenden Standards der Derivate bedarf, ist die Bestimmung der Reaktionsausbeuten sehr aufwendig. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit stattdessen die Stoffumsätze verwendet. Dies war möglich, da die Nebenreaktionen in der Mehrzahl der Fälle nicht ins Gewicht fallen. Alternativ besteht die Möglichkeit, die Reaktionsausbeuten mit Hilfe des Atomemissionsdetektors

zu bestimmen, da bei diesem die Signale unabhängig von der Verbindung sind und einzig von der aufgegebenen Stoffmenge abhängen (CIC - compound independent calibration). Somit kann mit einer beliebigen Iod-Verbindung kalibriert werden, vorausgesetzt diese verhält sich bei der Extraktion und Probenaufgabe ähnlich der zu untersuchenden Verbindung.

Die beobachteten Nebenreaktionen beschränken sich auf Reaktionen der Diazonium-Ionen mit Nucleophilen wie Wasser (Verkochen der Diazonium-Ionen), wohingegen andere Halogene weit weniger reaktiv sind und erst in hoher Konzentration z.B. durch Ansäuern mit Salzsäure stören [318]. Bei hohen Methanol-Konzentrationen ist die Reduktion der Derivate ebenso wie die Bildung von Methylphenylethern zu beobachten. Dagegen traten diese Verbindungen bei SPME und Methanolgehalten $\leq 0,1$ % nicht auf.

Die Reaktion ist in hohem Maße selektiv und führt zu keinerlei Gemischen iodierter Derivate. Demgegenüber kann die herkömmliche Acylierung stets zu mono- wie bisacylierten Verbindungen führen. Allerdings bleibt bei diesen Reaktionen die Aromat-Stickstoff-Bindung erhalten, während bei der Iodierung eine neue Bindung zum Aromaten geknüpft wird und eine C-N- durch eine C-I-Bindung ersetzt wird. Bislang wurden jedoch bei der Derivatisierung keinerlei Isomerisierungen beobachtet.

Zudem ist die Reaktion auf aromatische Amine beschränkt: Zwar lassen sich neben aromatischen auch aliphatische Amine diazotieren, diese reagieren jedoch rasch mit Wasser, so dass keinerlei störende Iod-Verbindungen zu beobachten waren. Im Vergleich dazu sind herkömmliche Reagenzien zur Derivatisierung aromatischer Amine wie die Säureanhydride und Chloroformiate sehr elektrophil und reagieren neben aromatischen auch mit aliphatischen Aminogruppen [334] oder Phenolen [249, 255, 335–339]. Dagegen wurden in Urin lediglich die Derivate aromatischer Amine detektiert. Die verwendete Flüssig-flüssig-Extraktion dient dabei weniger der Abtrennung von Verbindungen, die gleichermaßen zu iodierten Derivaten führen können, sondern vielmehr der Aufreinigung zur Erleichterung der Identifizierung. Mit einer derart selektiven Reaktion wird die Voraussetzung geschaffen, aromatische Amine selektiv nach Derivatisierung zu detektieren (vgl. Kap. 8.4).

In-situ Derivatisierung-SPME wurde 1997 von PAN und PAWLISZYN zur Bestimmung

von Fettsäuren eingeführt [340]. Da die Umsetzung direkt in der wässrigen Probe erfolgt, bedarf es geeigneter Reagenzien, wodurch die Zahl der Anwendungen stark beschränkt wird. Neben Essigsäureanhydrid [336–339] wurden Chloroformiate [341–343] sowie Benzylbromid [341, 344], Benzoylchlorid [345] und Dimethylsulfat [346, 347] eingesetzt. Die Anwendungen konzentrieren sich auf die Derivatisierung von Phenolen [336–339], Carbonsäuren [341, 342, 344, 346, 347] und Amphetaminen [343, 345]. Für aromatische Amine hat in-situ Derivatisierung-SPME bislang keinerlei Anwendung gefunden. Generell bilden die Bedingungen einen Kompromiss zwischen Reaktivität und Stabilität des Reagenzes, bei dem die Hydrolyse des Reagenzes [341, 342], hohe Überschüsse [341] und geringe Empfindlichkeit [342] berichtet wurden. Folglich sind die Verfahren auf wenige Analyten optimiert und nicht für desaktivierte elektronenarme Analyten geeignet.

Demgegenüber wird die Diazotierung mit anschließender Iodierung üblicherweise in wässriger Lösung durchgeführt und ist sehr breit anwendbar. Obwohl die Reaktion ebenfalls auf der Nucleophilie der Amine beruht, können selbst dinitrierte Aniline mit guten Stoffumsätzen überführt werden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren kann über den pH-Wert die Reaktivität des Diazotierungsreagenzes beeinflusst werden, ohne dass Reaktionen mit Wasser etc. bestimmend werden. Während für stark basische aromatische Amine moderate pH-Werte um $\text{pH} \approx 1$ genügen, wird für schwach basische Amine die Verwendung konzentrierter Säuren empfohlen [280, 282]. Ein vollständiger Stoffumsatz ist nicht erforderlich, da in gleicher Weise über das gesamte Verfahren kalibriert wird.

Eine Limitierung erfahren die in-situ Derivatisierungsverfahren bei den Probevolumina. Mit der Vergrößerung der Probevolumina nehmen die Kosten für die Reagenzien gleichermaßen zu und die Handhabung der Proben bei der Derivatisierung wird aufwendiger. So ist die verwendete Iodwasserstoffsäure als kostenintensivstes Reagenz etwa 30x teurer als Salzsäure. Angesichts der großen Probevolumina für eine vergleichbare Aufkonzentrierung ist die in-situ Derivatisierung nur bedingt kompatibel mit Festphasenextraktion und Flüssig-Flüssig-Extraktion, eröffnet aber neben der SPME auch interessante Anwendungen für die on-line SPE.

8.2 Extraktion der Derivate

Die Festphasenmikroextraktion hat sich mit zahlreichen Anwendungen neben der Festphasenextraktion und der Flüssig-flüssig-Extraktion etabliert. Für polare Analyten ist sie aber nur eingeschränkt und auf Kosten der Empfindlichkeit einsetzbar. Dieser Limitierung wurde in der Arbeit mit der in-situ Derivatisierung begegnet.

Die Eignung der Derivate für die Festphasenmikroextraktion wurde anhand einer Reihe von Modellverbindungen untersucht. Zum Schutz der SPME-Faser war es erforderlich, den pH-Wert im Anschluss an die Derivatisierung einfach und zuverlässig einzustellen. Für die Verbindungen wurden die Extraktionsbedingungen optimiert und der Einfluss verschiedener Extraktionsparameter untersucht. Die Anreicherung der iodierten Derivate erfolgte direkt aus der Probe durch manuelle Extraktion ebenso wie unter Verwendung eines Autosamplers. Darüber hinaus wurde die Eignung der Derivate für die Headspace-Extraktion untersucht. Dazu wurde eine Extraktionseinheit entwickelt, die die präzise Thermostatisierung der Proben ermöglichte.

Bislang war die Anreicherung aromatischer Amine mittels Festphasenmikroextraktion auf einige alkylierte, chlorierte und nitrierte Aniline beschränkt und die Extraktion aus dem Headspace wirkte sich negativ auf die Empfindlichkeit aus. Durch die in-situ Derivatisierung wurde die Polarität der Verbindungen gemessen an den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{OW} um durchschnittlich 1,9 Größenordnungen vermindert. Dadurch ließ sich neben den alkylierten, halogenierten und nitrierten Anilinen vor allem die Anreicherung der polareren Dinitroaniline und Dianiline entscheidend verbessern. Die überwiegende Zahl der Derivate war zudem für die Headspace-Extraktion geeignet, mit der auch biologische Matrices zugänglich wurden.

Die Festphasenmikroextraktion erwies sich als wesentlich vielseitiger als die Festphasenextraktion. Durch die kleineren Probevolumina konnten biologische Proben einbezogen werden, aus denen sich die Derivate anders als bei SPE auch aus dem Headspace anreichern ließen. Zudem war SPME weniger anfällig gegenüber Matrixbestandteilen, die auch aufgrund der großen Probevolumina zu einer Verstopfung der SPE-Kartuschen führen können. Bei SPME stören Matrixbestandteile weniger die Durchführung der Extraktion sondern eher die Gleichgewichtseinstellung, indem sie in Konkurrenz zur

Faser treten und ebenfalls die Analyten binden.

Erst bei der Thermodesorption im heißen Injektor können anhaftende Matrixbestandteile zu einer irreversiblen Schädigung der Beschichtung führen. Bei Urin wurde dem durch Extraktion der aromatischen Amine mittels Flüssig-flüssig-Extraktion begegnet. Da diese aufwendig ist, müssen insbesondere für eine Quantifizierung Alternativen erarbeitet werden. Im einfachsten Fall lassen sich Matrixbestandteile durch Abspülen der Faser entfernen [348, 349]. Stattdessen kann auch durch Filtrieren, Zentrifugieren oder enzymatische Hydrolyse Abhilfe geschaffen werden [350]. Eine interessante Alternative ist darüber hinaus die von MULLET *et al.* verwendete gröbenselektive SPME-Faser [351].

Dagegen bedarf es bei der Extraktion aus dem Headspace keines zusätzlichen Arbeitsschrittes und die Faser wird weniger beansprucht. Die Faser konnte so etwa 100x wiederverwendet werden, während bei direkter Extraktion von Wasserproben die Lebensdauer je nach Matrixbelastung auf etwa 30 Zyklen zurückgeht und bei Urin auf wenige Extraktionen beschränkt ist. Im Gegensatz zur direkten Extraktion erfolgt bei der Extraktion aus dem Headspace die Gleichgewichtseinstellung aufgrund der höheren Diffusionskoeffizienten in der Gasphase in der Regel rascher. Während sich die Äquilibrierungszeiten der Derivate ohne Nitro-Substituenten bei direkter Extraktion meist zwischen 2 und 3 Stunden bewegen, findet man bei Headspace-Extraktion für die früh eluierenden Substanzen Äquilibrierungszeiten weit unter einer Stunde. Dabei erfolgte die Durchmischung der Proben bei direkter Extraktion durch Vibration der Faser, während im anderen Fall die Probe gerührt wurde. Unter optimierten Bedingungen führte die Headspace-Extraktion bei gleicher Extraktionszeit zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit durch Steigerung der extrahierten Stoffmenge. Gleichzeitig wurde bereits bei einer Extraktionszeit von 25 min für viele Analyten der Gleichgewichtszustand erreicht, wodurch die Extraktion weniger anfällig gegenüber Störungen ist.

Anders als bei direkter hat bei Headspace-Extraktion jeder Analyt seine optimale Extraktionstemperatur außerhalb derer die Extrahierbarkeit abnimmt. Deshalb machen sich die Vorteile der Headspace-Extraktion bei den Analyten bemerkbar, deren Temperaturoptimum mit der Extraktionstemperatur vereinbar ist. Umgekehrt beobachtet man bei den spät eluierenden Verbindungen mit höherem Temperaturoptimum eine

deutlich langsamere Einstellung des Gleichgewichts. Folglich ist dieser zusätzliche Parameter eine Einschränkung des Verfahrens, wenn wie hier viele unterschiedliche Analyten detektiert werden. Die Extraktionstemperatur ist stets nur ein Kompromiss, der in diesem Fall nicht geeignet ist für die Extraktion der dinitrierten Verbindungen. Diese lassen sich auch durch Steigerung der Extraktionstemperatur nicht hinreichend aus dem Headspace anreichern, wohingegen sich bei den anderen spät eluierenden Verbindungen die Empfindlichkeit noch deutlich verbessern lässt. Das Erreichen der optimalen Extraktionstemperatur ist insbesondere für 4,4'MDA und 1,5DANa fraglich, da eine Extrapolation anhand der vorhandenen Daten eine Temperatur über 100°C ergibt.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen SPME-Fasern sind sowohl bei direkter als auch bei Headspace-Extraktion gering. Lediglich zwischen den Verteilungsfasern (PDMS und PA) und den auf DVB basierenden Fasern mit adsorptiven Eigenschaften sind größere Unterschiede zu erkennen. Aufgrund der größeren Oberfläche wurden mit letzteren die besseren Ergebnisse erzielt. Dabei erwies sich die PDMS/DVB-Faser als besonders robust, während die CW/DVB sich rasch braun verfärbte. Demgegenüber könnten sich die Verteilungsfasern durch den viskosen Flüssigkeitsfilm für die direkte Extraktion von Urinproben als interessant erweisen, da sich makromolekulare Matrixbestandteile leichter als von der porösen DVB-Beschichtung entfernen lassen.

Die Zugabe von Salz zur Verbesserung der Extrahierbarkeit ist bei direkter Extraktion kritisch zu beurteilen, da die nötigen hohen Salzkonzentrationen zu Ablagerungen im Injektor und zu einer raschen Zerstörung der Faser führen. Dagegen ist die Salzzugabe interessant für die Headspace-Extraktion, um den Einfluss unterschiedlicher Salzkonzentrationen bei Realproben zu überdecken.

Die komplette Extraktion mit anschließender Probenaufgabe lässt sich automatisieren. Dies wurde für die direkte Extraktion gezeigt, wohingegen für die Headspace-Extraktion ein mittlerweile kommerziell erhältlicher beheizbarer Autosampler nicht zur Verfügung stand. Durch die Anpassung der Extraktionszeit an die Dauer des GC-Laufs konnten bei Verwendung eines Autosamplers mehr als 30 Proben pro Tag analysiert werden, wohingegen mit manueller Extraktion bis zu 20 Proben untersucht wurden. Mit einem

derartigen Probenroboter lassen sich auch komplexe Probenvorbereitungen bearbeiten. Schwierig ist dagegen immer noch die exakte Thermostatisierung der Proben, die bei den kommerziellen Geräten über einen beheizbaren Metallblock erfolgt. Die eigene Extraktionsapparatur verwendet ein gerührtes Wasserbad, in dem der Wärmetransfer zur Probe durch den unmittelbaren Kontakt zum Wasser verbessert und Temperaturschwankungen auf weniger als $\pm 1^\circ\text{C}$ vermindert wurden. Auf diese Weise ließ sich auch ohne Internen Standard eine Reproduzierbarkeit erzielen, die der automatisierten Extraktion vergleichbar ist.

Ein wesentlicher Vorteil des Autosamplers ist die präzise Positionierung der Faser bei Extraktion und Desorption. Je nach Position der Faser wurden bei Extraktionen vor Erreichen des Gleichgewichts deutliche Unterschiede beobachtet, die sich durch Verwendung eines Internen Standards kompensieren lassen. Andererseits wird im Vergleich zur manuellen Extraktion die Faser beim Durchstechen des Septums mit einem Autosampler leichter verbogen.

8.3 Depletion-SPME

Die bei der mehrfachen Extraktion einer Probe zu beobachtende exponentielle Abnahme der Analytkonzentration konnte zur Bestimmung von Extraktionsraten bei SPME verwendet werden. Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der theoretischen Beschreibung. Für viele der untersuchten Pestizide erhält man eine gute Reproduzierbarkeit und kleine Vertrauensintervalle. Dagegen erwiesen sich polare Analyten wie Triazine und Pirimicarb unter den verwendeten Bedingungen als problematisch, da diese nur in geringem Maße angereichert werden. Dem kann durch Anpassung der anfänglichen Analytkonzentration und Extraktion unter Gleichgewichtsbedingungen begegnet werden. Auf diese Weise wird die extrahierte Stoffmenge erhöht und Schwankungen der Extraktionszeit, -temperatur oder Durchmischung der Probe vermindert. Umgekehrt wurde bei den Fasern mit adsorptiven Eigenschaften ein Rückgang der Extraktionsrate mit steigender Analytkonzentration beobachtet. Die Proportionalität zwischen Analytkonzentration und extrahierter Stoffmenge ist mit

beginnender Sättigung der Sorptionsstellen nicht mehr gegeben. Demzufolge müssen die Extraktionsbedingungen bei der Bestimmung von Extraktionsraten sorgfältig an die jeweilige Fragestellung angepasst werden.

Das der depletion-SPME zugrunde liegende Modell ist ausgesprochen einfach. Durch Einbeziehung weiterer Kompartimente lässt es sich an die experimentellen Gegebenheiten anpassen. So kann die Beschreibung verbessert und das Modell zur Untersuchung komplexer Verteilungsprozesse herangezogen werden. Während nd-SPME die Störung des Gleichgewichts vermeidet, kann depletion-SPME durch gezielte Störung weitere Informationen über Verteilungsprozesse liefern.

Depletion-SPME und Flüssiginjektion lassen sich nur bei sorgfältiger Wahl der Injektionsbedingungen vergleichen, da leicht Volumenfehler auftreten können. Das tatsächlich aufgegebene Volumen ist bei der GC nicht bekannt und lässt sich aufgrund des geringen Volumens nur schwer bestimmen. Dies ist in der Regel auch nicht erforderlich, da für Kalibrierung und Bestimmung gleiche Volumina abgemessen werden und sich die Abweichungen dadurch aufheben. Bei der Flüssigkalibrierung zur Bestimmung der Extraktionsrate ist dies nicht der Fall, da hier mit Flüssiginjektion und SPME unterschiedliche Verfahren miteinander verglichen werden. Dadurch können bereits kleine Volumenfehler von 0,1 μL , wie sie bei den üblichen 10 μL Spritzen leicht auftreten können, zu Abweichungen von $\geq 10\%$ führen. Dies verdeutlicht, wie sorgfältig bei der Bestimmung von Verteilungskoeffizienten die Injektionsbedingungen bei der Flüssig-Kalibrierung gewählt werden müssen. Zudem ist dies eine plausible Erklärung für die in der Literatur beschriebenen Verteilungskoeffizienten, die sich bei gleicher Faser teilweise um mehr als eine Größenordnung unterscheiden [137, 139, 352].

Darüber hinaus ist bei depletion-SPME die Bestimmung der Extraktionsraten ohne Kenntnis der anfänglichen Konzentration möglich. Es bedarf lediglich der Probe aber keiner Referenz-Verbindungen für eine Kalibrierung. Damit sind auch unbekannte Verbindungen zugänglich. Wie am Beispiel der Derivatisierung gezeigt wurde, lassen sich mit depletion-SPME auch für Verbindungen, für die kein Standard verfügbar ist, Verteilungskoeffizienten bestimmen.

8.4 Trennung und Identifizierung

Die aromatischen Amine wurden nach Derivatisierung und Extraktion mittels Gaschromatographie getrennt. Für die anschließende Detektion kam neben verschiedenen Massenspektrometern ein Atomemissionsdetektor zum Einsatz. Ebenso ließen sich die Verbindungen mit HPLC-UV trennen und detektieren.

Während die aromatischen Amine nur bedingt für die gaschromatographische Trennung geeignet sind, traten bei den iodierten Derivaten keinerlei Probleme auf. Adsorptionsphänomene, die bei den Aminen leicht zu Tailing führen, wurden durch die Derivatisierung beseitigt. Die Derivate zeigten eine gute Peakform mit wenig Tailing und erwiesen sich als thermisch stabil. Je nach Anwendung ließen sich bis zu 26 Analyten innerhalb von 20 min weitestgehend basisliniengetrennt detektieren.

Die Verwendung der Stx-CLPesticides-Säule mit einer speziellen Siltek-Deaktivierung für thermisch labile Substanzen war dafür nicht zwingend erforderlich, da sich die Derivate als stabil erwiesen. Die Stx-CLPesticides-Säule verfügt über eine der DB5 vergleichbare Polarität, mit der sich die Derivate ebenfalls sehr gut trennen ließen. Bis auf wenige Ausnahmen blieb dabei die Elutionsreihenfolge erhalten.

Die Trennung von Isomeren war generell kein Problem. Lediglich bei den kleineren Derivaten beispielsweise der Aminotoluole ließen sich die Verbindungen nur unzureichend trennen. Dagegen ließen sich viele der isomeren Ethyl- und Dimethylaniline auftrennen. Dies ist insofern von Bedeutung, da die Verbindungen massenspektrometrisch häufig kaum zu unterscheiden sind.

Der Atomemissionsdetektor lieferte über lange Zeit ein stabiles Signal, das keinerlei Drift zeigte. Bei sachgemäßer Handhabung traten auch bei komplexen Proben keine Ablagerungen in der Discharge Tube auf. Der Detektor überzeugte durch die hohe Selektivität, mit der sich einzelne Elemente gegenüber anderen detektieren ließen. So war auch bei Urinproben ohne LLE trotz massiver Matrixbelastung keine Störung des Iod-Signals zu beobachten. Die Empfindlichkeit, die stark von der verwendeten Emissionslinie abhing, war im Fall von I183 gut. Alternativ konnte auch die Iod-Linie I206 mit etwas geringerer Empfindlichkeit verwendet werden. Dafür mangelt es dem AED an Strukturinforma-

tionen, die eine Identifizierung unbekannter Verbindungen ermöglichen. Zwar lässt sich neben der Retentionszeit die Elementzusammensetzung der Verbindung ermitteln. Jedoch reicht diese besonders bei komplexen Proben wie Urin nicht aus, um die Derivate zu identifizieren.

Die Detektion ist zudem auf wenige Elemente beschränkt, die simultan erfasst werden können. Insbesondere im Vergleich mit dem massenspektrometrischen Detektor ist der AED weniger flexibel bei der Einstellung der Mess- und Detektionsbedingungen. Die Vielzahl der Emissionslinien lässt sich nicht ausschöpfen, da nur ein fester Satz zur Verfügung steht. Außerdem lassen sich die Anregungsbedingungen nicht wie beim Massenspektrometer beeinflussen, so dass eine gezielte Detektion funktioneller Gruppen über Molekülbanden nicht möglich ist.

Analog dem Iod-Signal I183 des AED können iodhaltige Verbindungen mit dem Massenspektrometer über das I^+ -Fragment mit der Masse 127 ausfindig gemacht werden. AED und MS liefern dabei sehr ähnliche Chromatogramme, was den Vergleich beider einfach macht. Da die I^+ -Fragmente bei der Elektronenstoßionisation im Massenspektrometer nur in geringem Maße gebildet werden, ist das Signal des AED empfindlicher. Zudem können neben Iod auch andere Verbindungen zu einem Fragment der Masse 127 führen. Deshalb bietet der AED die bessere Selektivität, um in komplexen Matrices iodhaltige Derivate aufzuspüren.

Demgegenüber liefert der massenspektrometrische Detektor wichtige Strukturinformationen. Da die Derivate einen intensiven Molekülionenpeak zeigen, lässt sich die Summenformel für die meisten Verbindungen leicht berechnen. Infolge der Derivatisierung sind die Molekülmassen um 111 u je Aminogruppe verschoben. Dadurch ließen sich die Molekülionenpeaks wesentlich leichter ausfindig machen, da sie sich aufgrund der höheren Masse deutlich von einer Vielzahl unspezifischer Fragmentationen abhoben.

Zudem liefert die Fragmentierung wichtige Informationen. So ließen sich die Derivate der Aminobiphenyle und der C_3 -Chloraniline, die beide die Molekülmassenzahl 280 haben, über die Fragmentationen leicht unterscheiden. Dies ist bei Isomeren dagegen nur in einigen Fällen möglich. Besonders bei den alkylierten Derivaten konnte aufgrund zahlreicher Isomere nur selten auf das Substitutionsmuster geschlossen werden. So lieferte die

Massenspektrometrie zwar wichtige Strukturinformationen, diese reichten aber häufig nicht für eine vollständige Identifizierung aus. Dabei sind die mittlerweile sehr umfangreichen Spektrenbibliotheken kritisch zu beurteilen: Sie liefern zwar wertvolle Strukturvorschläge, die aber ebenso wenig zur Unterscheidung von Isomeren dienen, zumal je nach verwendetem Gerät die Intensitäten der Fragmentionen teilweise deutliche Unterschiede erkennen ließen.

Für eine sichere Identifizierung sind Standard-Verbindungen unerlässlich, die mit der Retentionszeit eine weitere wichtige Information beitragen. Zudem können insbesondere bei komplexen Proben wie Urin in Anbetracht der Fülle von Verbindungen die hochauflösende Massenspektrometrie sowie MS/MS-Experimente zur Strukturaufklärung beitragen.

8.5 Screening mit paralleler Detektion

Bei vielen analytischen Fragestellungen handelt es sich nicht um einen Analyten sondern um eine ganze Reihe, meist strukturell eng verwandter Verbindungen, die überwacht werden müssen. So gibt es zahlreiche Pharmazeutika, bei denen sich die Wirkstoffe vom gleichen Grundgerüst ableiten und sich jeweils nur in wenigen Substituenten unterscheiden (z.B. Benzodiazepine). Der sensitive Nachweis solcher Substanzen erfolgt häufig massenspektrometrisch. Da die Detektion im fullscan-Modus gegenüber dem SIM-Modus mit Einbußen bei der Empfindlichkeit verbunden ist, ist sie meist auf wenige Verbindungen beschränkt [353, 354].

Dagegen braucht es für die Überwachung der ganzen Substanzklasse eines Detektors, mit dem sich diese selektiv detektieren lässt. Besonders der AED ist für die Detektion einer Vielzahl von Elementen geeignet, ohne dass eine Beeinflussung des Signals durch andere Kohlenstoff-Verbindungen zu beobachten ist. Neben Organozinn-, -blei- und -quecksilber-Verbindungen [355] wurde er häufig über die Heteroatome zum Nachweis von Pestiziden eingesetzt [307, 356]. Triazine lassen sich so selektiv über den Chlor-Substituenten nachweisen.

Abgesehen davon ist die Zahl der Elemente, die sich besonders in komplexen Matrices selektiv mit GC-AED detektieren lassen, in Anbetracht der Vielzahl interferierender

Verbindungen begrenzt. Es ist so nicht möglich, Verbindungen, die ausschließlich auf C,H,N,O aufgebaut sind, selektiv zu detektieren. Neue Anwendungen eröffnen sich erst durch eine Derivatisierung, bei der ein Heteroatom eingeführt wird. STEVENS *et al.* setzten deshalb isotope-markiertes Nicotin in Zigaretten ein, um die Verbrennungsprodukte anhand der Deuterium-Linie ausfindig machen zu können [357]. Die selektive Detektion von Alkenen neben Alkanen und Aromaten gelang HARDAS *et al.*, indem sie die untersuchten Benzinproben mit Brom derivatisierten [358]. Ebenso ließen sich Alkylphenole nach Derivatisierung mit Ferrocencarbonsäure selektiv in Rohöl detektieren, wobei ROLFES *et al.* die sehr hohe Empfindlichkeit des AED für Eisen ausnutzten [359]. Von ASMUSSEN *et al.* wurden Glykole zu TMS-Derivaten umgesetzt und selektiv über die Silicium-Linie bestimmt [360]. Bisher hat diese Vorgehensweise nur sehr wenige Anwendungen gefunden, da sie eine selektive Reaktion der Ausgangsverbindungen voraussetzt.

In dieser Arbeit wurde die Diazotierung mit anschließender Iodierung für die Derivatisierung aromatischer Amine verwendet, um die Verbindungen mit GC-AED über die Iod-Spur I183 nachzuweisen. Die Diazotierung erwies sich als geeignet, um selektiv Aminogruppen zu diazotieren. Mit dem Iodid wurde das Heteroatom eingeführt, das für die selektive Detektion erforderlich ist. Besonders in biologischen Proben war zur Unterscheidung aromatischer Amine von den in großer Zahl und Menge enthaltenen aliphatischen Aminen eine hohe Selektivität der Reaktion erforderlich. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, dass ausschließlich aromatische Amine zu Iodiden umgesetzt wurden.

Nach der Extraktion mit SPME konnten auf diese Weise in den Abwässern von Rüstungsalzlasten verschiedene aromatische Amine nachgewiesen werden. Abgesehen von wenigen kleinen konnten alle Peaks den Derivaten aromatischer Amine zugeordnet werden. Die Verbindungen wurden mit den entsprechenden Standards anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. Neben verschiedenen Nitro- und Dinitroanilinen wurden so auch einige vollständig reduzierte aromatische Amine nachgewiesen. Das Verfahren eignete sich zudem auch für die polaren Dianiline, von denen 2,4DA6NT, 2,6DA4NT und 1,3DAB nachgewiesen wurden.

Dagegen traten in den untersuchten Urinproben eine Vielzahl von Kohlenstoff- und Iod-Signalen auf. Um die Identifizierung zu erleichtern, wurden die Proben vor der Extraktion ausgeschüttelt. Durch LLE unter basischen Bedingungen und anschließende Rückextraktion im Säuren konnte ein Großteil der Matrixverbindungen abgetrennt werden. Während die Zahl der Kohlenstoff-Signale drastisch verringert wurde, blieb die Zahl der Iod-Signale weitgehend unverändert. Lediglich einige Verbindungen, die im nachhinein als Phenole identifiziert wurden, gingen so verloren. Dieser zusätzliche Schritt war mit einem beträchtlichen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden, zudem die Phasentrennung mitunter nur langsam erfolgte. Versuche ohne LLE deuteten darauf hin, dass diese für die Quantifizierung nicht erforderlich ist, sofern aus dem Headspace extrahiert wird. Anderenfalls ist eine Aufreinigung der Probe notwendig, um einer raschen Zerstörung der SPME-Faser entgegenzuwirken.

Auch nach der Aufreinigung durch LLE traten noch eine Vielzahl von Iod-Signalen auf, die nicht vollständig getrennt wurden. Für derart komplexe Trennungen bedarf es gekoppelter Techniken (hyphenated techniques, vgl. Review von WILSON *et al.* [361]) oder zweidimensionaler Chromatographie (GCxGC). Zudem ist die Identifizierung aller Verbindungen mit den entsprechenden Standards allein nicht möglich. Vielmehr bedarf es eines massenspektrometrischen Detektors, der durch zusätzliche Strukturinformationen eine Identifizierung gestattet.

GC-AED und GC-MS wurden bereits mehrfach gemeinsam eingesetzt, um unbekannte Verbindungen zu identifizieren, da sie komplementäre Informationen liefern [357, 362–378]. So lässt sich mittels AED die Elementzusammensetzung errechnen, die vom MS durch Molekülmasse und Fragmentierung ergänzt wird. So konnten LANIEWSKI *et al.* durch Einsatz der Gaschromatographie mit verschiedenen Detektoren Verunreinigungen in Pharmazeutika identifizieren [373, 374]. Dabei werden in der Regel voneinander unabhängige Geräte verwendet. Dies erschwert die Identifizierung, da infolge unterschiedlicher Detektordrücke auch bei ansonsten identischen Trennbedingungen die Retentionszeiten nicht übereinstimmen.

Da besonders bei komplexen Gemischen eine sehr gute Übereinstimmung der Retentionszeiten erforderlich ist, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Im einfachsten Fall

erfolgt die Zuordnung durch den Vergleich der Retentionsindices, bei denen man der Probe bekannte Substanzen zusetzt, an denen man sich orientieren kann [366, 369–372]. Zudem kann durch Anpassung des Säulenvordrucks eine gute Übereinstimmung erzielt werden [357, 366–368]. Da sich der Fluss mit dem Temperaturprogramm ändert, ist eine sehr sorgfältige Anpassung mit elektronischer Druckkontrolle (electronic pressure control, EPC) notwendig. Dies ist mit einer speziellen Software über das „Retention Time Locking“ möglich [365]. Dazu bedarf es lediglich eines Standards, der mit beiden Geräten bei unterschiedlichen Druckprogrammen analysiert wird.

Am einfachsten ist die Auswertung, wenn nur ein Gerät verwendet wird, das die parallele Detektion mit beiden Detektoren gestattet [362–364]. Die aufgegebene Stoffmenge kann dazu direkt nach der Injektion [362] oder erst nach der chromatographischen Trennung geteilt werden [363, 364]. Im ersten Fall bedarf es zweier Trennsäulen, deren Längen so angepasst werden, dass die Retentionszeiten übereinstimmen. Dagegen wird im anderen Fall der Split durch die unterschiedlichen Transfersäulen eingestellt. Da hier die Druckunterschiede größer sind, ist eine sehr präzise Abmessung erforderlich. Auf diese Weise können die Abweichungen der Retentionszeiten auf ≤ 1 s herabgesetzt werden [364].

Auf ein solches Gerät wurde bei der Identifizierung der Derivate zurückgegriffen. Die Retentionszeiten waren um 0,125 min gegeneinander verschoben, da durch die Anpassung der Länge der Transfersäulen das Splitverhältnis zugunsten des AED verändert wurde. Diese Verschiebung ließ sich leicht korrigieren, da sie sich über den gesamten chromatographischen Lauf nicht veränderte. Durch Vergleich der beiden Chromatogramme konnte jedem Iod-Signal das zugehörige Massenspektrum zugeordnet werden. Erleichtert wurde der Vergleich, da bei Verwendung von Iod-Linie I183 und Massenspur 127 m/z nicht nur die Retentionszeiten sondern auch die Intensitätsverhältnisse einander ähnlich sind. Da sich die Derivate aromatischer Amine leicht an typischen Fragmentationen erkennen lassen, konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass jedes Iod-Signal auf das Derivat eines aromatischen Amins zurückzuführen ist. Es traten keinerlei Störungen durch andere Iod-Verbindungen auf. Für einige sind die zugeordneten Verbindungen nur Strukturvorschläge, die mit weiterführenden MS-Experimenten untermauert werden

müssen.

Gefunden wurden so vor allem alkylierte und chlorierte aromatische Amine und Diamine, die die Chromatogramme nicht nur zahlen- sondern auch mengenmäßig dominieren. Zudem wurden auch eine Vielzahl bicyclischer Verbindungen identifiziert. Die Eignung des Verfahrens für höher annellierte aromatische Amine muss geprüft werden, da unter den Bedingungen keinerlei tricyclische Amine gefunden wurden. Andererseits deuten die Beobachtungen darauf hin, dass mit der Zahl der Ringe sowohl die Zahl der Verbindungen als auch deren Menge abnimmt. Ebenso verhielt es sich mit den heterocyclischen aromatischen Aminen, von denen einige nachgewiesen wurden. Da nichts über ihr Auftreten in Urin bekannt ist, muss geklärt werden, inwieweit die Derivatisierung für heterocyclische Verbindungen geeignet ist.

Insgesamt wurde das Substanzspektrum der im Urin nachgewiesenen aromatischen Amine erheblich erweitert. Neben den bislang bekannten Anilinen konnte zudem eine große Zahl homologer Verbindungen identifiziert werden. So wurden beispielsweise neben den Aminobiphenylen auch zahlreiche alkylierte Derivate gefunden. Anders als bei GRIMMER *et al.* traten bei der Lagerung der Proben keine Probleme auf [40]. Ebenso wenig decken sich die Ergebnisse mit WEISS *et al.*, die nur in einer der untersuchten Proben Naphthylamin und Aminobiphenyl nachweisen konnten [61].

Es ist wahrscheinlich, dass die Hydrolyse, deren Einfluss bislang nur wenig untersucht wurde, eine maßgebliche Rolle spielt. So traten nach saurer Hydrolyse weitaus mehr Peaks auf als nach basischer. SKARPING *et al.* fanden unter basischen Bedingungen doppelt so viel 2,4- und 2,6DAT wie unter sauren [23, 317]. Jedoch wurden infolge der basischen Hydrolyse bei dotierten Urinproben 70 % Verlust bei vicinal-substituierten Diaminen gefunden. Da SKARPING *et al.* auch nach 240 h keine vollständige Hydrolyse erreichten, ist es unwahrscheinlich, dass die Amine wie bislang angenommen im wesentlichen acyliert vorliegen [23]. Darüber hinaus ist es für das Verständnis des Metabolismus wichtig, die Bindungsverhältnisse der aromatischen Amine aufzuklären.

Mit dem Verfahren ließen sich rasch Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern aufzeigen. Interessanterweise unterschieden sich Zahl und Menge der auftretenden Derivate beim Passivraucher kaum von denen des Rauchers. Es bedarf weiterer Un-

tersuchungen, um Verbindungen ausfindig zu machen, die Raucher von Nichtrauchern unterscheiden. Auf diese Weise kann dazu beigetragen werden, das bei Rauchern erhöhte Krebsrisiko zu erklären. Da das Verfahren eine sehr weitreichende Überwachung gestattet, ist es möglich, mehr über die Quellen aromatischer Amine zu erfahren. So deutet das Auftreten vieler homologer Verbindungen auf eine wenig spezifische Bildung hin, wie sie bei allen Arten von Verbrennungsprozessen zu finden sind. Möglicherweise lassen sich anhand der Verteilung von monocyclischen zu annellierten Verbindungen weitere Informationen über die Entstehungsbedingungen ableiten.

8.6 Quantifizierung

Für die Quantifizierung wurde über das gesamte Verfahren kalibriert. Dazu wurden die Proben für die Kalibrierung genauso derivatisiert und extrahiert wie die zu bestimmenden Proben. Dies ist einerseits in Ermangelung der iodierten Standards erforderlich, führt andererseits aber auch zu guten Resultaten, da sich Unregelmäßigkeiten bei Derivatisierung und Extraktion so kompensieren lassen. Im Anschluss an die Derivatisierung wurden die Verbindungen durch automatisierte direkte Extraktion angereichert und mit GC-MS bestimmt. Zum Vergleich wurde ebenso manuell extrahiert und die Derivate mit GC-AED bestimmt. Auf diese Weise wurden verschiedene nitroaromatische Amine im Abwasser von Rüstungsaltlasten mit GC-MS und GC-AED bestimmt.

Bei automatisierter Extraktion erhält man für die nitrosubstituierten aromatischen Amine mit durchschnittlich 5,5 % eine gute Reproduzierbarkeit ($n=8$), wohingegen die durchschnittlichen Relativen Standardabweichungen der Verbindungen ohne Nitro-Substituenten nur 16,6 % betragen. Diese Unterschiede sind auf die Einstellung des pH-Werts mit Natronlauge und Phosphat-Puffer zurückzuführen, die bei den Verbindungen ohne Nitro-Substituenten zu einer allmählichen Abnahme der Peakflächen führt. Durch Verwendung eines Internen Standards kehren sich die Verhältnisse um. So betragen die Relativen Standardabweichungen der Verbindungen ohne Nitro-Substituenten durchschnittlich 16,5 % im Vergleich zu 8,0 % für die nitrosubstituierten ($n=8$). Folglich ist Anilin-d₅ als Interner Standard nicht gleichermaßen für alle aromatischen Amine

geeignet und es bedarf weiterer Verbindungen, um den individuellen Eigenschaften der Analyten gerecht zu werden.

Demgegenüber wurde bei manueller Extraktion der pH-Wert nach der Derivatisierung durch Zugabe von Acetat-Puffer eingestellt. Statt eines alkalischen pH-Werts wurden die Proben einheitlich auf $\text{pH} \approx 5$ eingestellt. Hier konnte anhand der Relativen Standardabweichungen nicht mehr auf die Nitrosubstitution geschlossen werden. Ohne Internen Standard wurde für die nitrosubstituierten Derivate eine Relative Standardabweichung von 7,2 % bestimmt, verglichen mit 7,6 % bei den Verbindungen ohne Nitro-Substituenten ($n = 7$). Dies gibt zugleich einen Eindruck von der hohen Qualität der manuellen Extraktion, obwohl sich beispielsweise die Extraktionszeit und die Position der Faser bei Extraktion und Desorption weniger gut regeln ließen. Zu der guten Reproduzierbarkeit trägt die verwendete Apparatur bei, mit der die Proben gleichmäßig gerührt und thermostatisiert werden können.

Die besten Ergebnisse wurden mit der Headspace-Extraktion erzielt. Mit einer durchschnittlichen Relativen Standardabweichung von 6,6 % ohne bzw. 5,5 % mit Internem Standard macht sich die raschere Gleichgewichtseinstellung deutlich bemerkbar ($n = 6$). Angesichts der zusätzlichen Derivatisierung sind die guten Reproduzierbarkeiten gegenüber herkömmlichen Verfahren um so höher zu bewerten.

Matrixverbindungen in Realproben können sowohl die Derivatisierung als auch die Extraktion beeinflussen (Aussalzeffekt). Die Wiederfindungsraten wichen ohne Internen Standard in einigen Fällen um mehr als 20 % gegenüber Reinstwasser ab. Die Abweichungen nahmen dabei mit zunehmender Matrixbelastung zu. Um diese zu kompensieren, bedarf es geeigneter Interner Standards, deren Eigenschaften möglichst gut mit denen der Analyten übereinstimmen. Wichtig ist hier die Verwendung mehrerer Verbindungen, da die Analyten unterschiedlich auf eine erhöhte Salzkonzentration ansprechen. Alternativ können Matrixeffekte auch durch Salzzugabe zu allen Proben überdeckt werden. Davon ist bei direkter Extraktion abzusehen, da bei den erforderlichen Konzentrationen anhaftendes Salz rasch zu Ablagerungen im Insert-Liner und einer Zerstörung der Faser führen kann. Da bei Standardaddition eine einheitliche Matrix zugrunde gelegt wird, lassen sich so Matrixeffekte am besten kompensieren. Bei

Verwendung eines Internen Standards wurde eine gute Übereinstimmung von Externer Kalibrierung und Standardaddition gefunden.

Ausgehend von 10 mL Probe wurden mit automatisierter Extraktion und Bestimmung mit GC-MS für 15 der 18 Analyten Nachweisgrenzen zwischen 2 und 13 ng/L erzielt. Lediglich bei 2A4,6DNT, 4A2,6DNT und 2,4DA6NT, die als letzte eluierten, betrug die Nachweisgrenzen 38 ng/L, 27 ng/L bzw. 30 ng/L. Dies ist weniger auf ein vermindertes Signal sondern vielmehr auf ein höheres Rauschen infolge des bei den höheren Temperaturen stärkeren Säulenblutens zurückzuführen. Damit sind die Nachweisgrenzen für die chlorierten aromatischen Amine vergleichbar mit anderen SPME-Publikationen [205, 206]. Für die polarerer alkylierten und nitrierten aromatischen Amine ist die Methode zumindest um eine Größenordnung empfindlicher [209, 210, 212]. Viele der Analyten wie die polare Diaminotoluole wurden erstmals mit SPME untersucht. Nachweisgrenzen im unteren ng/L-Bereich wurden auch für die Festphasenextraktion berichtet, jedoch ist das benötigte Probenvolumen deutlich größer. Zudem wurde für die Festphasenextraktion der Diamino-Verbindungen aufgrund der hohen Polarität ein rasches Durchbrechen berichtet [166, 174, 182].

Die sehr guten Nachweisgrenzen sind im Wesentlichen auf die Derivatisierung zurückzuführen, mit der sich die Extrahierbarkeit der Analyten entscheidend verbessern lässt. Darüber hinaus sind die Massen der Derivate um 111 m/z gegenüber den Ausgangsverbindungen verschoben. Dadurch wird das Rauschen durch unspezifische Fragmente vermindert und somit die Empfindlichkeit verbessert. Weiterhin tragen die hohen Stoffumsätze bei der Derivatisierung zur guten Empfindlichkeit bei.

Angesichts der effizienten Anreicherung können die Derivate im fullscan-Modus detektiert werden. Damit steht das gesamte Massenspektrum für eine sichere Identifizierung zur Verfügung. Ferner lassen sich auf diese Weise auch unbekannt Analyten nachweisen. Dies ist besonders bei den etablierten Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine in Urin nicht der Fall. Üblicherweise werden hier 5 mL Urin extrahiert, derivatisiert und auf ≈ 40 μL konzentriert, wovon 1 μL aufgegeben werden. Folglich werden nur 2,5 % der zur Verfügung stehenden Stoffmenge verwendet, weshalb für die erforderliche Empfindlichkeit single ion monitoring (SIM) unabdingbar ist. Eine derart selektive

Detektion ist für unbekannte Verbindungen von Nachteil, da sie so leicht nicht erfasst und übersehen werden. Demgegenüber werden durch die in-situ Derivatisierung je nach Analyt zwischen 12 und 30 % der Stoffmenge mit SPME angereichert. Diese Effizienz ist maßgeblich für die Leistungsfähigkeit des Verfahrens verantwortlich.

Mit der Massenspektrometrie mit negativer chemischer Ionisation (NCI-MS) bietet sich eine Möglichkeit zur weiteren Verbesserung der Empfindlichkeit. Durch Anlagerung eines Elektrons entstehen dabei zunächst Molekülanionen, wobei die Empfindlichkeit entscheidend vom Elektroneneinfangverhalten abhängt. NCI-MS ähnelt damit der Detektion mit einem Elektroneneinfangdetektor (electron capture detector, ECD), mit dem Iod-Verbindungen gegenüber Brom-, Chlor- und Fluor-Verbindungen die besten Ergebnisse erzielen [379].

Für eine Quantifizierung der aromatischen Amine in Urin muss zunächst der Einfluss der Matrix auf Derivatisierung und Extraktion geprüft werden. Falls eine Kompensation nicht möglich ist, können die Derivate über Standardaddition bestimmt werden. Da in Urin sehr viele aromatische Amine auftreten, können nicht alle einzeln mit den entsprechenden Standards quantifiziert werden. Es bleibt zu prüfen, ob neben der Beschränkung auf die Verbindungen mit der höchsten Toxizität Alternativen zur Verfügung stehen. Eine Möglichkeit besteht in der Einführung eines Summenparameters, mit dem die Gesamtmenge Iod der Derivate bestimmt wird. Darüber hinaus bietet der AED die Möglichkeit der verbindungsunabhängigen Kalibrierung (compound-independent calibration, CIC). Mit nur einer Iod-Verbindung ließen sich so alle anderen bestimmen. Dies scheitert bei dem präsentierten Verfahren an der Festphasenmikroextraktion, mit der die Verbindungen individuell angereichert werden. Demzufolge bedarf es einer erschöpfenden Extraktion, wie sie sich mit SPE oder Flüssig-flüssig-Extraktion erreichen lässt. Andererseits lässt sich dies auch mit SPME durch mehrfache Extraktion erreichen, wie die Arbeiten von SCHÄFER *et al.* zur multiplen Headspace-Extraktion zeigen [313].

9 Zusammenfassung und Ausblick

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Analytik polarer Verbindungen, die sich nur schwer extrahieren lassen. Am Beispiel aromatischer Amine wurde ein in-situ Derivatisierungsverfahren zur Verbesserung der Extrahierbarkeit entwickelt. Dabei wurden die Verbindungen direkt in wässriger Lösung diazotiert und durch Zugabe von Iodid zu aromatischen Iod-Verbindungen umgesetzt. Die Polarität der Analyten wurde dadurch gemessen an den Verteilungskoeffizienten um durchschnittlich 2 Größenordnungen je Aminogruppe vermindert, so dass selbst polare aromatische Amine sehr gut mit SPME angereichert werden konnten.

Mit GC-MS wurden für die untersuchten aromatischen Amine Nachweisgrenzen im unteren ng/L-Bereich erzielt. Durch die Detektion im fullscan-Modus war neben einer sicheren Identifizierung gleichzeitig der Nachweis unbekannter Verbindungen möglich. Dabei genügte ein Probevolumen von nur 10 mL, was zugleich die Voraussetzung zur Analyse biologischer Matrices schaffte. Trotz der zusätzlichen Derivatisierung waren die Reproduzierbarkeiten mit denen etablierter Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine vergleichbar. Durch die Verwendung Interner Standards ließ sich der Einfluss von Matrixverbindungen auf die Gleichgewichtseinstellung kompensieren. Mit dem Verfahren konnten zahlreiche aromatische Amine erstmals mit SPME im Abwasser von Rüstungsaltslasten bestimmt werden.

Das Verfahren war auf ein breites Spektrum aromatischer Amine anwendbar, die sich zusammen derivatisieren und analysieren ließen. Neben alkylierten und halogenierten aromatischen Aminen war die Derivatisierung gleichermaßen für desaktivierte nitrierte und dinitrierte sowie Diamino-Verbindungen geeignet.

Die Derivate ließen sich selektiv über den Iod-Substituenten mit GC-AED detektieren, ohne dass Beeinträchtigungen durch Matrixkomponenten auftraten. Auf diese Weise ließen sich aromatische Amine schnell und einfach im Abwasser von Rüstungsaltslasten auffindig machen.

Die Übertragung auf komplexe Matrices erforderte zum Schutz der SPME-Faser die Extraktion aus dem Headspace. Dabei wurde das Gleichgewicht rascher erreicht, so dass

bereits nach 25 min die Extraktion vieler Analyten unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgte. Dadurch ließen sich für die Mehrzahl der Analyten die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit weiter verbessern.

Mit dem Ziel einer umfassenden Untersuchung aromatischer Amine wurde das in-situ Derivatisierung-SPME-Verfahren auf Urin angewendet. Nach saurer Hydrolyse wurde eine Vielzahl iodierter Verbindungen in Urin gefunden. Die Derivatisierung erwies sich dabei als hochgradig selektiv, da selbst in einer derart komplexen Matrix ausschließlich die Derivate aromatischer Amine auftraten. Bei der Detektion der Iod-Verbindungen über GC-AED wurden keinerlei Störungen durch biogene Iod-Verbindungen oder andere Amine beobachtet.

Durch die parallele Detektion mit GC-AED/MS konnte anhand der Massenspektren jedem Iod-Signal ein aromatisches Amin zugeordnet werden. Durch den Vergleich der Iod-Spur des AED mit der Massenspur 127 m/z des MS war die Identifizierung besonders einfach. Insgesamt konnte die Zahl der in Urin nachgewiesenen aromatischen Amine erheblich erweitert werden. So wurden über das in-situ Derivatisierungsverfahren mit GC-MS über 200 aromatische Amine als iodierete Derivate identifiziert. Es handelte sich vorwiegend um alkylierte und chlorierte Aniline. Neben den bislang bekannten wurde eine Vielzahl homologer Verbindungen gefunden. Erstmals wurden neben den Aminobiphenylen und Naphthylaminen zahlreiche alkylierte Homologe identifiziert. Das Verfahren eignete sich zudem auch für die polaren Diamino-Verbindungen ebenso wie für Aminophenole, von denen einige in Urin nachgewiesen wurden. Gleichzeitig wurden mit Aminopyridinen und Aminochinolinen auch einige heteroaromatische Amine gefunden.

In Zukunft soll das Verfahren durch den umfassenden Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern helfen, das bei Rauchern erhöhte Krebsrisiko zu erklären. Dazu soll das Verfahren erweitert und auch die Amine einbezogen werden, die nur durch direkte Extraktion erfasst werden. Vor der Quantifizierung der Verbindungen in Urin, ist eine genaue Untersuchung der Hydrolyse-Bedingungen erforderlich. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit soll das Elektroneneinfang-Verhalten der Iodide bei der massenspektrometrischen Detektion mit negativer chemischer Ionisation (NCI-MS) untersucht und die geringe Fragmentierung der Derivate für MS/MS-Experimente genutzt werden.

10 Experimenteller Teil

10.1 Geräte

Varian GC-MS-Gerät

- Gerät: GC Star 3800 mit Saturn 2000 ion-trap MS (Varian, Darmstadt)
EI (70 eV)
Transferline: 280 °C, Manifold: 55 °C, Trap: 200 °C
- Autosampler: Varian 8200CX mit SPME Kit III
- Injektor: Varian 1079 PTV-Injektor
- Insert-Liner: Fokus-Liner, 3,4 mm ID, mit Quarzwolle gefüllt von SGE (Darmstadt)
SPME-Liner, 0,8 mm ID, mit Siltek-Deaktivierung von Restek (Bad Homburg v.d.H)
- Trennsäulen: DB-5ms, 30 m, 0,25 mm ID, 0,1 µm Filmdicke von J&W (Waldbronn)
Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke mit Siltek
Deaktivierung von Restek (Bad Homburg v.d.H.)
- Software: Varian Saturn GCMS Workstation Version 5.40

HP GC-AED-Gerät

- Gerät: GC 6890 mit AED G 2350A von Hewlett-Packard (Waldbronn)
Transferline: 260°C, Cavity: 250°C
Helium Supply Pressure: 30 psi, Cavity Pressure: 2,0 psi
- Autosampler: HP 7673 für Flüssiginjektion
- Injektor: EPC split/splitless Injektor
- Insert-Liner: Splitless-Liner, 4 mm ID, gefüllt mit Quarzwolle
SPME-Liner, 0,8 mm ID von Supelco (Taufkirchen)
- Trennsäule: Stx-CLPesticides, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke mit Siltek
Deaktivierung von Restek (Bad Homburg v.d.H)
HP5, 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke von Hewlett Packard
- Software: GC ChemStation Rev. A.03.03

JAS GC-AED/MS-Gerät

Gerät: GC 6890 mit AED G 2350A und MSD 5973inert von JAS (Moers)
AED: Transferline: 280°C, Cavity: 300°C
Helium Supply Pressure: 30 psi, Cavity Pressure: 1,5 psi
MSD: EI (70 eV), Multiplier-Spannung: 1200 V
Ionenquelle: 230°C, Transferline: 260°C
Injektor: UNIS 2100 PTV-Injektor von JAS (Moers)
Trennsäule: DB5, 60 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke von Agilent (Waldbronn)
Transfersäule: MSD: 1 m, 0,1 mm ID; AED: 6 m, 0,25 mm ID
Software: GC ChemStation Rev. A.10.02, MSD ChemStation Rev. D.01.00

Thermo Finnigan GC-MS-Gerät

Gerät: Trace DSQ von Thermo Finnigan (Austin, Texas)
EI (70 eV), Multiplier-Spannung: 1000 V
Transferline: 250°C, Ionenquelle: 220°C
Injektor: PTV-Injektor
Insert-Liner: Siltek liner, 2 mm ID, Restek (Bad Homburg v.d.H.)
Trennsäule: DB-5, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Software: Xcalibur 1.4 SR1 mit NIST MS Search, Version 2.0

Gynkotec HPLC-Gerät

Gerät: HPLC-UV von Gynkotec (Germering)
Pumpe: M 480
Entgaser: ERC-3315
Autosampler: Gina 50
Detektor: UV-Detektor 160S
Trennsäule: Purospher RP18 (125 x 3 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt)
Software: Gynkosoft Version 5.50

10.1.1 Sonstige Geräte

Magnetrührer MR 3001 K von Heidolph (Schwabach)

Temperaturregler EKT 3000 von Heidolph (Schwabach)

Laborrührer RZR 1 von Heidolph (Schwabach)

Pipetten von Eppendorf (Hamburg)

Probenkonzentrator Turbo Vap LV von Zymark (Idstein)

Umwälzthermostat VC5 von Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach)

Wasserbad 3044 von Köttermann (Hängisen)

Schüttler 4010 von Köttermann (Hängisen)

Analysenwaage BP301S von Satorius (Göttingen)

Ultraschallbad Sonorex Super RK255H von Bandelin (Berlin)

pH-Meter CG840 von Schott (Hofheim)

Rührfische 15x4,5mm, Roth (Karlsruhe)

10.1.2 SPME-Fasern

Filmdicke	Bezeichnung	Beschichtung
100 µm	PDMS	Polydimethylsiloxan
85 µm	PA	Polyacrylat
65 µm	PDMS/DVB	Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen ^a
75 µm	Car/PDMS	Carboxen/Polydimethylsiloxan
65 µm	CW/DVB	Carbowax/Divinylbenzen ^b
50/30 µm	DVB/Car/PDMS	Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan, Stableflex-Faser

^a wahlweise auch als StableFlex-Faser mit 65 µm bzw. ^b 70 µm Dicke; alle von Supelco (Taufkirchen)

10.2 Chemikalien

Tabelle 44: Verwendete Grundchemikalien mit Angabe der Bezugsquelle und der Reinheit

Chemikalien	Bezugsquelle; Reinheit
Amidosulfonsäure	Aldrich; A.C.S.-Reagenz
Ammoniak	Baker, 25 %ig; p.a.
Dichlordimethylsilan	Merck-Schuchardt; frisch destilliert
Ethylacetat	Merck; für die HPLC
<i>n</i> -Hexan	Acros; frei von halogenierten Kohlenwasserstoffen
Iodpentafluorbenzol	Aldrich; 99 %
Iodwasserstoffsäure	Aldrich, 55%ig, unstabilisiert; A.C.S.-Reagenz
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haën; p.a.
Lithiumchlorid	Roth; p.a.
Methanol	Merck oder Baker; für die HPLC
Natrium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	Merck; p.a.
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haën; p.a.
Natriumacetat	Baker, wasserfrei; p.a.
Natriumazid	Fluka; p.a.
Natriumhydroxid	Fluka; p.a.
Natriumnitrit	Riedel-de-Haën; p.a.
Natriumsulfit	Merck; p.a.
Salzsäure	Riedel-de-Haën, 37 %ig; A.C.S.-Reagenz
Toluol	Merck; p.a.
2-Trifluormethyliodbenzol	Aldrich; 99 %
Wasser	über Millipore Q _{Plus} 185 gereinigt

Tabelle 45: Als Referenzsubstanzen verwendete aromatische Amine mit Abkürzung, Bezugsquelle und Gefahrensymbol. Für eine eindeutige Zuordnung sind die CAS-Nummern angegeben.

Abkürzung	Substanz	CAS-Nr.	Bezugsquelle	Gefahrensymbol
A-d5	Anilin-d5	4165-61-1	Aldrich	T,N
A	Anilin	62-53-3	Aldrich ^a	T,N
4AT	4-Aminotoluol	106-49-0	Fluka	T,N
2,6DMA	2,6-Dimethylanilin	87-62-7	Aldrich	T,N
3,5DMA	3,5-Dimethylanilin	108-69-0	Aldrich	T,N
2,4,6TMA	2,4,6-Trimethylanilin	88-05-1	Aldrich	T+
4IPA	4-Isopropylanilin	99-88-7	Aldrich	Xi
2E6MA	2-Ethyl-6-methylanilin	24549-06-2	Aldrich	Xn
2,6DEA	2,6-Diethylanilin	579-66-8	Aldrich	Xn
2CA	2-Chloranilin	95-51-2	Riedel-de-Haën	T,N
4CA	4-Chloranilin	106-47-8	Riedel-de-Haën	T,N
4C2MA	4-Chlor-2-methylanilin	95-69-2	Riedel-de-Haën	T
2,4DCA	2,4-Dichloranilin	554-00-7	Riedel-de-Haën	T,N
2,6DCA	2,6-Dichloranilin	608-31-1	Riedel-de-Haën	T,N
3,4DCA	3,4-Dichloranilin	95-76-1	Riedel-de-Haën	T,N
2,4,5TCA	2,4,5-Trichloranilin	636-30-6	Riedel-de-Haën	T,N
3C4FA	3-Chlor-4-fluoranilin	367-21-5	Riedel-de-Haën	Xn
1,3DAB	1,3-Diaminobenzol	108-45-2	Aldrich	T,N
2,4DAT	2,4-Diaminotoluol	95-80-7	Promochem	T,N
2,6DAT	2,6-Diaminotoluol	823-40-5	Aldrich	Xn,N
1,5DANa	1,5-Diaminonaphthalin	2243-62-1	Avocado	Xn,N
4,4'MDA	4,4'-Methyldianilin	101-77-9	Fluka	T,N
1NaA	1-Naphthylamin	134-32-7	Merck	T,N
2NaA	2-Naphthylamin	91-59-8	Aldrich	T,N
2AB	2-Aminobiphenyl	90-41-5	Aldrich	Xn

^a frisch destilliert; ^b synthetisiert nach [380]; ^c umkristallisiert.

Tabelle 45: Als Referenzsubstanzen verwendete aromatische Amine mit Abkürzung, CAS-Nr., Bezugsquelle und Gefahrensymbol (Forts.)

Abkürzung	Substanz	CAS-Nr.	Bezugsquelle	Gefahrensymbol
4AB	4-Aminobiphenyl	92-67-1	Aldrich	T
3NA	3-Nitroanilin	99-09-2	Baker	T
4NA	4-Nitroanilin	100-01-6	Baker	T
3,5DNA	3,5-Dinitroanilin	618-87-1	Riedel-de-Haën	T
2A3NT	2-Amino-3-nitrotoluol	570-24-1	Merck	T,N
2A4NT	2-Amino-4-nitrotoluol	99-55-8	Aldrich	T
2A5NT	2-Amino-5-nitrotoluol	99-52-5	Janssen	T,N
2A6NT	2-Amino-6-nitrotoluol	603-83-8	Aldrich	T,N
4A2NT	4-Amino-2-nitrotoluol	119-32-4	Janssen	T,N
4A3NT	4-Amino-3-nitrotoluol	89-62-3	Janssen	T,N
2F5NA	2-Fluor-5-nitroanilin	369-36-8	Aldrich	F,Xi
2,5DM4NA	2,5-Dimethyl-4-nitroanilin	3460-29-5	Höchst ^c	
3,5DM4NA	3,5-Dimethyl-4-nitroanilin	34761-82-5	Höchst ^c	
2A4,6DNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol	35572-78-2	Promochem	T
4A2,6DNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol	19406-51-0	Promochem	T
2,4DA6NT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol	6629-29-4	Promochem	T
2,6DA4NT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol	59229-75-3	^b	

^a frisch destilliert; ^b synthetisiert nach [380]; ^c umkristallisiert.

Die Verbindungen lagen in der höchsten erhältlichen Qualität vor oder wurden vor der Verwendung destilliert. Soweit vom Hersteller nicht anders angegeben, wurden Feststoffe bei Raumtemperatur aufbewahrt und Flüssigkeiten bei 4°C gekühlt gelagert.

Tabelle 46: Als Referenzsubstanzen verwendete Pestizide mit CAS-Nr. und Bezugsquelle

Substanz	CAS-Nr.	Bezugsquelle	Gefahrensymbol
Atrazin	1912-24-9	Riedel-de-Haën	Xn
Ethofumesat	26225-79-6	Promochem	Xn
Fenpropimorph	67564-91-4	Riedel-de-Haën	-
Lindan γ -HCH	58-89-9	Promochem	T,N
Parathion-ethyl	56-38-2	Riedel-de-Haën	T+,N
Pendimethalin	40487-42-1	Promochem	Xn
Pirimicarb	23103-98-2	Riedel-de-Haën	T
Propazin	139-40-2	Promochem	Xn
Prosulfocarb	52888-80-9	Riedel-de-Haën	Xn
Sebuthylazin	7286-69-3	Riedel-de-Haën	-
Terbuthylazin	5915-41-3	Riedel-de-Haën	Xn
Terbutryn	886-50-0	Promochem	-
Trifluralin	1582-09-8	Riedel-de-Haën	Xi

10.3 Verwendete Lösungen

10.3.1 Herstellung der Stammlösungen

Es wurden Stammlösungen von allen in den Tab. 45 und 46 aufgeführten Verbindungen hergestellt. Dazu wurden jeweils ca. 10 mg in einem Wägeschiffchen eingewogen und in einen 10 mL Messkolben überführt. Es wurde bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt. Die Lösungen wurden in 25 mL Vials bei -20°C aufbewahrt.

Die Konzentration der Analyten in den Stammlösungen betrug ca. 1 g/L.

10.3.2 Herstellung der Standard-Lösungen

Von einer Auswahl der Stammlösungen wurden verdünnte Arbeitsstandards hergestellt, indem je 250 μ L der Stammlösung in einem 25 mL-Messkolben mit Methanol verdünnt und bis zur Markierung aufgefüllt wurden. Die so hergestellten Standards mit einer Analytkonzentration von 10 mg/L wurden in 25 mL Vials bei -20°C aufbewahrt.

Auf diese Weise wurden Lösungen der in den Tab. 10, 19, 25 und 32 auf den Seiten 67, 89, 123 und 167 aufgeführten Analyten (abgesehen von den als Interne Standards gekennzeichneten Verbindungen) hergestellt.

10.3.3 Lösungen für die Kalibrierung

Zur Bestimmung der Elsnig-Proben mit GC-AED wurde ein Standard hergestellt, der an die Konzentrationsverhältnisse in den Realproben angepasst war und alle 19 in Tab. 25 auf Seite 123 aufgeführten Analyten enthielt. Abgesehen von den beiden Aminodinitrotoluolen, von denen jeweils 1000 μL zugegeben wurden, wurden je 100 μL der Stammlösung in einen 10 mL Messkolben pipettiert. Es wurde bis zur Markierung mit Millipore-Wasser aufgefüllt und die Lösung in einem 25 mL Vial bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentration der Analyten betrug 10 mg/L sowie 100 mg/L im Fall von 2A4,6DNT und 4A2,6DNT.

Für die Kalibrierung wurden Verdünnungen verwendet, die wie folgt hergestellt wurden: Die angegebenen Konzentrationen gelten für die Mehrzahl der Analyten, während für die beiden Aminodinitrotoluole eine 10fach höhere Konzentration angenommen werden kann:

Std I ($\beta = 1000 \mu\text{g/L}$): 1000 μL Std (10 mg/L) mit Wasser auf 10 mL verdünnt.

Std II ($\beta = 500 \mu\text{g/L}$): 500 μL Std (10 mg/L) mit Wasser auf 10 mL verdünnt.

Std III ($\beta = 100 \mu\text{g/L}$): 1000 μL Std I (1 mg/L) mit Wasser auf 10 mL verdünnt.

Std IV ($\beta = 50 \mu\text{g/L}$): 1000 μL Std II (0,5 mg/L) mit Wasser auf 10 mL verdünnt.

Std V ($\beta = 20 \mu\text{g/L}$): 200 μL Std I (1 mg/L) mit Wasser auf 10 mL verdünnt.

Für die Kalibrierung wurden 10 mL Wasser mit jeweils 100 μL der Standards I - V dotiert sowie mit jeweils 100 μL der Internen Standards IPFB (500 $\mu\text{g/L}$), 2TFMIB (500 $\mu\text{g/L}$), 3C4FA (250 $\mu\text{g/L}$) und 2F5NA (250 $\mu\text{g/L}$) versehen. Abgesehen von den Aminodinitrotoluolen lagen alle Analyten in den Kalibrierproben dementsprechend in Konzentrationen von 0,2 bis 10 $\mu\text{g/L}$ vor.

Für die Bestimmung der Stadtallendorf-Proben mit GC-MS wurden folgende Lösungen

verwendet: Ausgehend von dem Standard, der die 19 in Tab. 32 auf Seite 167 aufgeführten Analyten in einer Konzentration von 10 mg/L enthielt, wurden eine Reihe von Verdünnungen hergestellt: Dazu wurden mit Hamilton-Spritzen die jeweiligen Volumina (12,5 mL, 2,5 mL, 1 mL, 250 μ L, 125 μ L, 25 μ L) in 25 mL Messkolben pipettiert und bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt. Die Lösungen wurden in 25 mL Vials bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentrationen in den 6 Lösungen betragen 5 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L bzw. 0,01 mg/L.

Jede der 6 Lösungen wurde weiterhin im Verhältnis 1:10 verdünnt, indem 2,5 mL mit einer Hamilton-Spritze in einen 25 mL Messkolben gegeben wurden. Es wurde mit Millipore-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösungen wurden in 25 mL Vials umgefüllt und bei -20°C gelagert. Die Verdünnungen deckten einen Konzentrationsbereich von 1 bis 500 μ g/L ab. Wie oben beschrieben wurden bei der Kalibrierung jeweils 100 μ L zu einer 10 mL Probe gegeben.

10.3.4 Lösungen für die Standardaddition

Für die Standardaddition wurden die Dotierungslösungen individuell an die Konzentrationsverhältnisse in den Realproben angepasst. Die Analyten wurden zu Gruppen gleicher Konzentration zusammengefasst.

Von jeder Gruppe wurden zwei Lösungen hergestellt, die die aromatischen Amine in Konzentrationen von 10 mg/L und 500 μ g/L enthielten. Dazu wurden für die Lösungen mit einer Konzentration von 10 mg/L je 100 μ L der entsprechenden Stammlösungen in einen 10 mL Messkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. 500 μ L wurden zur Herstellung der 500 μ g/L Lösung entnommen und im Messkolben auf 10 mL verdünnt. Durch Mischen und Verdünnen der Gruppen wurden schließlich die 4 Dotierungslösungen hergestellt.

In diesen waren die Verbindungen der Gruppe I, 2A6NT, 4A2NT und 3,5DNA, in Konzentrationen zwischen 50 und 1000 μ g/L enthalten. Gruppe II bildete 4A2,6DNT mit einem Bereich von 100 bis 5000 μ g/L und Gruppe III 2A4,6DNT mit 50 - 2500 μ g/L.

Die verbleibenden 14 der in Tab. 25 auf Seite 123 aufgeführten Verbindungen wurden zu Gruppe IV mit einem Konzentrationsbereich von 20 - 500 µg/L zusammengefasst. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass bei einem Probevolumen von 10 mL einheitlich mit 100 µL der Lösungen versetzt wurde. Die Lösungen wurden in 25 mL Vials bei 4°C aufbewahrt.

10.3.5 Herstellung der Pufferlösung

Für die Herstellung eines Phosphat-Puffers ($c = 10$ mmol/L) mit einem pH-Wert von 7 wurden in einem 1 L Messkolben wurden 410 mg Kalium-*di*-hydrogenphosphat und 1250 mg *di*-Natriumhydrogenphosphat gelöst und bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt.

10.4 Optimierte Verfahren

10.4.1 Konditionierung der SPME-Fasern

Die Konditionierung der SPME-Fasern erfolgte in Anlehnung an die Herstellerangaben. Die Fasern wurden unter den in Tab. 47 angegebenen Bedingungen im Injektor bei einem konstanten Heliumstrom von 1,2 mL/min ausgeheizt. Die GC-Ofentemperatur betrug währenddessen 300 °C.

10.4.2 Reinigung der Glasgeräte und Silanisierung

Die Vials wurden vor der Silanisierung ausführlich gereinigt. Zunächst wurden sie dazu mit einer Bürste und Spülmittel gereinigt und anschließend sorgfältig zunächst mit Leitungswasser und dann mit bidest. Wasser gespült. Nach dem Abtropfen wurden die Vials mehrfach mit einem 1/1-Gemisch aus Ethanol und Aceton (V/V) nachgespült, das zuvor zweimal destilliert worden war. Die Glasgeräte wurden im Trockenschrank

mehrere Stunden auf 150°C erhitzt.

Für die Silanisierung wurden die Vials nach dem Abkühlen in eine Glaskammer mit Deckel gestellt, die zuvor mit einer Lösung von 220 mL Dichlordimethylsilan in 1300 mL Toluol p.a. befüllt wurde. Das Silan wurde vor der Verwendung destilliert. Nach 24 h wurden die Glasgeräte entnommen und mehrfach mit dem Ethanol-Aceton-Gemisch gespült. Zur weiteren Reinigung wurden die Vials mit bidest. Wasser gewaschen und mehrere Stunden auf 150°C erhitzt. Danach wurden sie mit einer Schraubkappe verschlossen aufbewahrt.

Die Rührfische wurden nach der Extraktion mit Wasser abgespült und anschließend mehrere Stunden in einem Soxhlet-Extraktor mit dem Aceton-Ethanol-Gemisch kontinuierlich gereinigt.

10.4.3 Vorbereitung der Urinproben

Nach dem Auftauen und Homogenisieren der Probe wurden 20 mL entnommen und in ein 30 mL Braunglas-Vial gefüllt. Es wurden 100 µL 3C4FA (250 µg/L) als Interner Standard zugegeben und mit 10 mL konz. Salzsäure angesäuert. In einem Umwälzthermostaten, der mit Polyethylenglykol betrieben wurde, wurde die Probe 12 h bei 110°C erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde in einen 100 mL Erlenmeyer-Kolben umgefüllt und 20 mL

Tabelle 47: Konditionierung der SPME-Fasern

SPME-Faser	Konditionierungsbedingungen
85 µm PA	300°C für 150 min
100 µm PDMS	250°C für 70 min
65 µm PDMS/DVB	260°C für 45 min
75 µm CAR/PDMS	250°C für 45 min
70 µm CW/DVB	250°C für 45 min
50/30 µm DVB/CAR/PDMS	270°C für 240 min

Natronlauge (10 mol/L) zugeben. Der entstandene Niederschlag wurde über Filterpapier abgetrennt. Das Filtrat wurde in einem 50 mL Tropftrichter (ohne Gasausgleich) mit PTFE-Küken aufgefangen. Die Probe wurde 3x mit jeweils 5 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden vor der Rückextraktion in einem 17 mL Vial mit 2 mL Natronlauge (0,1 mol/L) gewaschen und im Wasserbad leicht eingengt. Dann wurde die Probe mit 5 mL Wasser versetzt und nach dem Ansäuern mit 100 μ L konz. Salzsäure ausgeschüttelt. Nach 5minütiger Extraktion wurde die organische Phase verworfen. Lösungsmittelreste in der wässrigen Phase wurden in einem Probenkonzentrator bei 60°C innerhalb von 5 min im Stickstoff-Strom entfernt.

Die Probe wurde anschließend derivatisiert oder bis dahin bei 4°C aufbewahrt.

10.4.4 Derivatisierung

In ein 25 mL Vial wurden mit einer Vollpipette 10 mL der wässrigen Probe gefüllt. Es wurden 100 μ L Anilin-d5 (50 μ g/L, in Wasser) als Interner Standard zugeben. Bei Proben für die Kalibrierung wurden zusätzlich 100 μ L des entsprechenden Standards zugesetzt. Für die Zugabe der Reagenzien wurden die entsprechenden Eppendorf-Pipetten verwendet.

Die Proben wurden mit 200 μ L 55 %iger, unstabiler Iodwasserstoffsäure angesäuert und 200 μ L Natriumnitrit-Lösung ($\beta= 50$ g/L) zugefügt. Die Vials wurden 20 min geschüttelt. Anschließend wurde 1 mL Amidosulfonsäure ($\beta= 50$ g/L) zugegeben und die Proben weitere 45 min geschüttelt. Nach 5 min im Wasserbad bei 95°C ließ man auf Raumtemperatur abkühlen und fügte 250 μ L einer gesättigten Natriumsulfit-Lösung zu. Durch Zugabe von 250 μ L *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung ($c= 0,25$ mol/L) sowie 400 μ L Natronlauge ($c= 5$ mol/L) wurde der pH-Wert auf pH 9 eingestellt. Alternativ wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1000 μ L gesättigter Natriumacetat-Lösung auf 5 eingestellt.

Bei Derivatisierung von 5 mL Probe wurde entsprechend vorgegangen und alle Volumina wurden halbiert.

Für den Essigsäurethylester- bzw. Hexan-Extrakt wurden 2 mL zugegeben und das Vial 5 min geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde 1 mL der organischen Phase in ein 1,5 mL Autosampler-Vial pipettiert.

10.4.5 Derivatisierung-SPME

Im Anschluss an die Derivatisierung wurden die Proben bei Verwendung eines Autosamplers in geeignete 13 mL Vials umgefüllt und mit Aluminiumfolie und Bördelkappe verschlossen. Unter optimierten Bedingungen wurde die Probe mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser 30 min direkt extrahiert. Die Durchmischung der Probe erfolgte durch Vibration der Faser. Unmittelbar nach der Extraktion wurde die Faser im Injektor des GC thermodesorbiert. Dazu wurde ein Siltek-desaktivierter SPME-Liner mit 0,8 mm ID verwendet. Für eine vollständige Desorption wurde die Faser 5 min im Injektor belassen. Anschließend wurde die nächste Probe während des GC-Laufs extrahiert (prep ahead-Modus). Angesichts der Abreicherung der Analyten wurde jede Probe nur einmal extrahiert.

Bei manueller SPME wurden die Proben in den Vials belassen und nur die Schraubkappen durch Lochdeckel ersetzt. Es wurde ein 15x4,5 mm Rührfisch zugefügt und die Probe in die Extraktionsapparatur eingesetzt. Die Probe wurde bei maximaler Umdrehungszahl von 1250 U/min gerührt und nach einer Vorwärmzeit von 4 min die Faser eingebracht. Bei direkter Extraktion wurde bei Raumtemperatur extrahiert und das Septum am Rand der Lochkappe durchstoßen. Dadurch befand sich die Faser in einem stärker gerührten Bereich.

Bei Headspace-Extraktion wurde die Probe auf 60°C thermostatisiert und nach 4 min Vorwärmzeit die Faser mittig in den Dampfraum eingebracht. Die Extraktion erfolgte gleichfalls unter Rühren bei maximaler Umdrehungszahl. Die Proben wurden 25 min bzw. 30 min manuell extrahiert und die Fasern anschließend mit dem SPME-Inlet-Guide als Führungshilfe im Injektor des GC für 5 min thermodesorbiert. Auch hier wurde die nächste Probe bereits während des GC-Laufs extrahiert.

10.4.6 Depletion-SPME

Die Abreicherungs-Experimente wurden in 13 mL Autosampler-Vials durchgeführt. Die Gefäße wurden mit 13 mL Lösung befüllt und mit Aluminiumfolie und Bördekkappe verschlossen. Bis zur Bestimmung wurden sie bei 4°C aufbewahrt.

Für die Extraktion mittels Autosampler wurden die Proben für jeweils 20 min extrahiert. Die gesamte Extraktion, bei der die Proben durch Vibration der Faser durchmischt wurden, sowie die Probenaufgabe erfolgten automatisiert. Für die Desorption wurde ein SPME-Liner mit 0,8 mm ID und Siltek-Deaktivierung verwendet. Um Verschleppung zu vermeiden, wurden die Fasern 5 min im Injektor belassen. Bereits während des GC-Laufs wurde die nächste Probe extrahiert (prep ahead-Modus), die unmittelbar nach Ende der Extraktion aufgegeben wurde. Auf diese Weise wurde jede Probe mit der gleichen Faser zwischen 6 und 9x extrahiert.

10.5 Realproben

10.5.1 Wasserproben von Rüstungsalzlasten

Die untersuchten Proben stammen von der Rüstungsalzlast Elsnig in Sachsen. Sie wurden einer Pilotanlage zur Wasseraufbereitung an verschiedenen Stellen entnommen. Die Proben wurden in 0,5 L bzw. 1 L Braunglasflaschen bei 4°C aufbewahrt. Tab. 48 fasst pH-Wert, Leitfähigkeit und Farbe der Proben zusammen. Zur Stabilisierung wurde den Proben 0,5 g/L Natriumazid zugesetzt.

Darüber hinaus wurden zwei Proben der Rüstungsalzlast Stadtallendorf in Hessen untersucht. Die Proben der TRI-Halde wurden dem Abschöpfbrunnen ASB 3 bzw. dem Beobachtungsbrunnen P 2 am 6. Februar 2002 entnommen und in 2,5 L Braunglasflaschen bei 4°C gelagert. Die Probe von P 2 war gelblich trüb mit einem pH-Wert von 5,7 und einer Leitfähigkeit von 0,28 mS/cm. Die klare Probe von ASB 3 zeigte einen pH-Wert von 5,9 und eine Leitfähigkeit von 0,15 mS/cm. Da die Untersuchung dieser Proben unmittelbar nach der Probenahme erfolgte, wurde auf die Zugabe von

Natriumazid verzichtet.

Tabelle 48: Untersuchte Wasserproben der Rüstungsalzlast Elsnig vor und nach Durchlaufen der Wasseraufbereitungsanlage

Bezeichnung	pH-Wert	Leitfähigkeit /(mS/cm)	Farbe
Rohwasser 227 - 110 - 00	7,26	1,39	farblos
Rohwasser UTT Probe 2	6,88	1,42	farblos
Rohwasser UTT 08 10 2003	6,87	1,17	farblos
Rohwasser nach MF HGN 08 10 2003	6,87	1,13	farblos
Bioabbau 2003 11 21 - 14.46	6,64	1,86	gelblich, trüb
Bioabbau 2003 11 21 - 13.46	7,21	2,69	gelblich
Bioabbau 2003 11 19 - 14.44	6,44	2,16	leicht gelblich
Bioabbau 2003 11 19 - 14.43	6,51	1,78	gelblich, trüb
Bioabbau 2003 11 19 - 13.43	7,19	2,70	gelblich

10.5.2 Probenahme und Lagerung des Urins

Die Probenahme erfolgte in 100 mL PE-Flaschen. Zur Untersuchung der Stabilität der aromatischen Amine in Urin wurden die Flaschen vor der Probenahme mit 5 mL Salzsäure (6 mol/L) bzw. 50 µg 4AT + 5 mL Salzsäure (6 mol/L) versehen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben eingefroren und bei -20°C gelagert.

11 Literaturverzeichnis

- [1] P.F. Vogt, J.J. Gerulis
Amines, aromatic
in: W. Gerhartz (Hrsg.)
Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Band A 2, 37–56, VCH, Weinheim, 5. Auflage, 1985. **1**
- [2] G. Rippen
Handbuch der Umweltchemikalien (Loseblattsammlung)
Stand der 11. Ergänzungslieferung 8/1991, ecomed, Landsberg, 1990. **1**
- [3] M. Bernabei, R. Secli, G. Bocchinfuso
Determination of additives in synthetic base oils for gas turbine engines
J. Microcol. Sep. **12**, 585–592, 2000. **1**
- [4] S. V. Greene, V. J. Gatto
Size exclusion chromatography method for characterizing low-molecular-mass antioxidant lubricant additives
J. Chromatogr. A **841**, 45–54, 1999. **1**
- [5] D. E. Rickert (Hrsg.)
Toxicity of nitroaromatic compounds
Hemisphere Publishing Corp., Washington, 1985. **1**
- [6] J. C. Spain (Hrsg.)
Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives
Lewis, Boca Raton, 2000. **1**
- [7] B. C. Alleman, A. Leeson (Hrsg.)
Bioremediation of nitroaromatic and haloaromatic compounds
Battelle Press, Columbus, 1999. **1**
- [8] V. Mersch-Sundermann (Hrsg.)
Umweltmedizin
Thieme, Stuttgart, 1999. **1**
- [9] E.A. Clarke, R. Anliker
Organic dyes and pigments
in: O. Hutzinger (Hrsg.)
Handbook of environmental chemistry, Band 3A, 181–215, Springer, Heidelberg, 1980. **1**
- [10] K. H. Domsch
Pestizide im Boden
VCH, Weinheim, 1992. **1**
- [11] G. Sabbioni, H. G. Neumann
Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides
Carcinogenesis **11**, 111–115, 1990. **1**

-
- [12] O. Osano, W. Admiraal, H. J. C. Klamer, E. A. J. Bleeker
Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*
Environ. Poll. **119**, 195–202, 2002. [1](#)
- [13] U. Dorfler, I. Scheunert
Verbleib von Pflanzenschutzmitteln in der Umwelt
Umweltbundesamt, Berlin, 1989. [1](#)
- [14] D. Barceló, M. C. Hennion
Trace determination of pesticides and their degradation products in water
Elsevier, Amsterdam, 1997. [1](#)
- [15] T. Schettgen, T. Weiss, J. Angerer
Biological monitoring of phenmedipham: determination of *m*-toluidine in urine
Arch. Toxicol. **75**, 145–149, 2001. [1](#), [2](#), [8](#), [30](#), [131](#)
- [16] R. Pastorelli, G. Catenacci, M. Guanci, R. Fanelli, E. Valoti, C. Minoia, L. Airoidi
3,4-dichloroaniline-haemoglobin adducts in humans: preliminary data on agricultural workers exposed to propanil
Biomarkers **3**, 227–233, 1998. [1](#)
- [17] F. F. Hsu, V. Lakshmi, N. Rothman, V. K. Bhatnager, R. B. Hayes, R. Kashyap, D. J. Parikh, S. K. Kashyap, J. Turk, T. Zenser, B. Davis
Determination of benzidine, *N*-acetylbenzidine, and *N,N'*-diacetylbenzidine in human urine by capillary gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry
Anal. Biochem. **234**, 183–189, 1996. [1](#), [8](#), [30](#)
- [18] T. R. Hatfield, E. C. Roberts, I. F. Bell, J. C. Clunie, P. J. Kalla, D. L. McKay
Urine monitoring of textile workers exposed to dichlorobenzidine-derived pigments
J. Occup. Med. **24**, 656–658, 1982. [1](#), [8](#)
- [19] D. Schütze, O. Sepai, J. Lewalter, L. Miksche, D. Henschler, G. Sabbioni
Biomonitoring of workers exposed to 4,4'-methylenedianiline or 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate
Carcinogenesis **16**, 573–582, 1995. [1](#), [8](#), [30](#), [131](#)
- [20] O. Sepai, D. Henschler, G. Sabbioni
Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate
Carcinogenesis **16**, 2583–2587, 1995. [1](#), [8](#), [131](#)
- [21] J. Cocker, A. R. Boobis, D. S. Davies
Determination of the *N*-acetyl metabolites of 4,4'-methylene dianiline and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) in urine
Biomed. Environ. Mass Spectrom. **17**, 161–167, 1988. [1](#), [8](#), [30](#)
- [22] K. Jedrzejczak, V. S. Gajnd
Determination of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in urine using capillary gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry
Analyst **117**, 1417–1420, 1992. [1](#), [8](#), [30](#), [131](#)

- [23] G. Skarping, M. Dalene, P. Lind
Determination of toluenediamine isomers by capillary gas chromatography and chemical ionization mass spectrometry with special reference to the biological monitoring of 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate
J. Chromatogr. A **663**, 199–210, 1994. [1](#), [8](#), [33](#), [129](#), [131](#), [134](#), [161](#), [220](#)
- [24] P. Carbonnelle, S. Boukourt, D. Lison, J. P. Buchet
Determination of toluenediamines in urine of workers occupationally exposed to isocyanates by high-performance liquid chromatography
Analyst **121**, 663–669, 1996. [1](#), [8](#), [129](#), [131](#), [161](#)
- [25] J. F. Sandström, G. Skarping, M. Dalene
Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines
J. Chromatogr. **479**, 135–143, 1989. [1](#), [8](#), [129](#), [131](#), [161](#)
- [26] C. Rosenberg, H. Savolainen
Determination of occupational exposure to toluene diisocyanate by biological monitoring
J. Chromatogr. **367**, 385–392, 1986. [1](#), [8](#), [129](#), [131](#), [161](#)
- [27] G. T. Vaughan, R. S. Kenyon
Monitoring for occupational exposure to 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of haemoglobin adducts, blood, plasma and urine
J. Chromatogr. B **678**, 197–204, 1996. [1](#), [8](#), [30](#), [131](#)
- [28] S. S. Hecht
Human urinary carcinogen metabolites: Biomarkers for investigating tobacco and cancer
Carcinogenesis **23**, 907–922, 2002. [1](#)
- [29] P. Vineis, R. Pirastu
Aromatic amines and cancer
Cancer Causes Control **8**, 346–355, 1997. [1](#)
- [30] G. Talaska
Aromatic amines and human urinary bladder cancer: exposure sources and epidemiology
J. Environ. Sci. Health C **21**, 29–43, 2003. [1](#)
- [31] A. Seidel, D. Dahmann, H. Krekeler, J. Jacob
Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust
Int. J. Hyg. Environ. Health **204**, 333–338, 2002. [1](#), [8](#)
- [32] I. Zwirner-Baier, H. G. Neumann
Polycyclic nitroarenes (nitro-PAHs) as biomarkers of exposure to diesel exhaust
Mut. Res. **441**, 135–144, 1999. [1](#), [2](#)
- [33] S. Shin, K. Sakanishi, I. Mochida, D. A. Grudoski, J. H. Shinn
Identification and reactivity of nitrogen molecular species in gas oils
Energy & Fuels **14**, 539–544, 2000. [1](#)
- [34] T. C. Schmidt, P. Kleinert, C. Stengel, K. U. Goss, S. B. Haderlein
Polar fuel constituents: Compound identification and equilibrium partitioning between non-aqueous phase liquids and water
Environ. Sci. Technol. **36**, 4074–4080, 2002. [1](#)

-
- [35] J. Riedel, W. Dekant
Biotransformation and toxicokinetics of musk xylene in humans
Toxicol. Appl. Pharmacol. **157**, 145–155, 1999. [2](#)
- [36] W. Johnson
Final report on the safety assessment of m-phenylenediamine and m-phenylenediamine sulfate
Int. J. Toxicol **16**, 59–115, 1997. [2](#)
- [37] M. C. Garrigós, F. Reche, K. Pernías, A. Sánchez, A. Jiménez
Determination of some aromatic amines in finger-paints for children's use by supercritical fluid extraction combined with gas chromatography
J. Chromatogr. A **819**, 259–266, 1998. [2](#), [31](#), [32](#)
- [38] D. Hernando, J. Saurina, S. Hernández-Cassou
Liquid chromatographic determination of aniline in table-top sweeteners based on pre-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate
J. Chromatogr. A **859**, 227–233, 1999. [2](#)
- [39] G. Palmiotto, G. Pieraccini, G. Moneti, P. Dolara
Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy
Chemosphere **43**, 355–361, 2001. [2](#)
- [40] G. Grimmer, G. Dettbarn, A. Seidel, J. Jacob
Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers
Sci. Total Environ. **247**, 81–90, 2000. [2](#), [8](#), [30](#), [33](#), [129](#), [131](#), [146](#), [163](#), [220](#)
- [41] P. Upadhyaya, A. K. Roy, P. P. Fu, K. Elbayoumy
Metabolism and DNA-binding of 2-nitropyrene in the rat
Carcinogenesis **52**, 1176–1181, 1992. [2](#)
- [42] M. S. Bryant, H. F. Simmons, R. E. Harrell, J. A. Hinson
2,6-Dimethylaniline hemoglobin adducts from lidocaine in humans
Carcinogenesis **15**, 2287–2290, 1994. [2](#), [8](#), [30](#)
- [43] N. W. Puente, P. D. Josephy
Analysis of the lidocaine metabolite 2, 6-dimethylaniline in bovine and human milk
J. Anal. Toxicol. **25**, 711–715, 2001. [2](#), [8](#), [28](#), [29](#), [30](#), [31](#), [32](#)
- [44] H. Marquardt, S. G. Schäfer (Hrsg.)
Lehrbuch der Toxikologie
Spektrum, Heidelberg, 1997. [2](#), [3](#), [161](#)
- [45] L. Rehn
Blasengeschwulste bei Anilinarbeitern
Arch. Klin. Chi. **50**, 588–600, 1895. [2](#)
- [46] <http://www.iarc.fr>. [3](#), [7](#)
- [47] L. S. Gold, E. Zeiger (Hrsg.)
Handbook of carcinogenic potency and genotoxicity databases
CRC, Boca Raton, 1997. [3](#)
- [48] F. A. Beland, F. F. Kadlubar
Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons
in: C. S. Cooper
Chemical carcinogenesis and mutagenesis, Band 1, 267–325, Springer, Berlin, 1990. [4](#)

- [49] *Aromatic amino and nitro-amino compounds and their halogenated derivatives*
in: E. Bingham, B. Cohrssen, C. H. Powell (Hrsg.)
Patty's toxicology, Wiley, New York, 5. Auflage, 2001. 3
- [50] G. Sabbioni, C. R. Jones
Biomonitoring of arylamines and nitroarenes
Biomarkers 7, 347–421, 2002. 3
- [51] J. Lewalter, P. Biedermann
in: J. Angerer, K. H. Schaller (Hrsg.)
Analyses of hazardous substances in biological materials, Band 4, 67–105, VCH, Weinheim, 1994.
3, 30, 33
- [52] R. Greger, U. Windhorst
Comprehensive human physiology
Band 2, Springer, Berlin, 1996. 6
- [53] J. Falbe, H. Römpp (Hrsg.)
Römpp Lexikon Chemie
Thieme, Stuttgart, 10. Auflage, 1999. 6
- [54] B. Branner, C. Kutzer, W. Zwickenpflug, G. Scherer, W. D. Heller, E. Richter
Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and non-smoking women
Biomarkers 3, 35–47, 1998. 8, 30
- [55] K. el-Bayoumy, J. M. Donahue, S. S. Hecht, D. Hoffmann
Identification and quantitative determination of aniline and toluidines in human urine
Cancer Res. 46, 6064–6067, 1986. 8, 30, 131
- [56] B. Falter, C. Kutzer, E. Richter
Biomonitoring of hemoglobin adducts - aromatic-amines and tobacco-specific nitrosamines
Clin. Invest. 72, 364–371, 1994. 8, 30, 154, 161
- [57] M. Riffelmann, G. Müller, W. Schmieding, W. Popp, K. Norpoth
Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and nonexposed control persons
Int. Arch. Occup. Environ. Health 68, 36–43, 1995. 8, 30, 33, 129, 131, 146, 161
- [58] G. Sabbioni, A. Beyerbach
Determination of hemoglobin adducts of arylamines in humans
J. Chromatogr. B 667, 75–83, 1995. 8, 30, 33
- [59] E. M. Ward, G. Sabbioni, D. G. DeBord, A. W. Teass, K. K. Brown, G. G. Talaska, D. R. Roberts, A. M. Ruder, R. P. Streicher
Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess
J. Natl. Cancer Inst. 88, 1046–1052, 1996. 8, 30
- [60] T. Weiß, U. Ewers, A. Fliegner, J. Angerer
Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Amino- und nitroaromatischen Verbindungen
Umweltmed. Forsch. Prax. 5, 101–106, 2000. 8, 30, 33, 129, 146

-
- [61] T. Weiss, J. Angerer
Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. B **778**, 179–192, 2002. [8](#), [30](#), [33](#), [34](#), [44](#), [131](#), [220](#)
- [62] W. G. Stillwell, M. S. Bryant, J. S. Wishnok
GC/MS analysis of biologically important aromatic amines - Application to human dosimetry
Biomed. Environ. Mass Spectrom. **14**, 221–227, 1987. [8](#), [30](#)
- [63] M. S. Bryant, P. Vineis, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum
Hemoglobin adducts of aromatic-amines - associations with smoking status and type of tobacco
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 9788–9791, 1988. [8](#), [30](#), [154](#), [161](#)
- [64] E. Richter, S. Rösler, G. Scherer, J. G. Gostomzyk, A. Gröbl, U. Krämer, H. Behrendt
Haemoglobin adducts from aromatic amines in children in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke
Int. Arch. Occup. Environ. Health **74**, 421–428, 2001. [8](#), [30](#)
- [65] J. P. Gan, P. L. Skipper, M. Gago-Dominguez, K. Arakawa, R. K. Ross, M. C. Yu, S. R. Tannenbaum
Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer
J. Natl. Cancer Inst. **96**, 1425–1431, 2004. [8](#)
- [66] A. Seidel, G. Grimmer, G. Dettbarn, J. Jacob
Urinary excretion of carcinogenic aromatic amines by nonsmokers
Umwelt. Forsch. Prax. **6**, 213–220, 2001. [8](#), [30](#), [131](#)
- [67] H. Wallin, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, J. P. A. Jensen, L. Rylander, J. H. Olsen
Altered aromatic amine metabolism in epileptic patients treated with phenobarbital
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **4**, 771–773, 1995. [8](#)
- [68] H. Bartsch, N. Caporaso, M. Coda, F. Kadlubar, C. Malaveille, P. Skipper, G. Talaska, S. R. Tannenbaum, P. Vineis
Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers
J. Natl. Cancer Inst. **82**, 1826–1831, 1990. [8](#)
- [69] M. S. Bryant, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, M. Maclure
Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers
Cancer Res. **47**, 602–608, 1987. [8](#), [30](#)
- [70] J. E. Castelao, J. M. Yuan, M. Gago-Dominguez, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, K. K. Chan, M. A. Watson, D. A. Bell, G. A. Coetzee, R. K. Ross, M. C. Yu
Carotenoids/vitamin C and smoking-related bladder cancer
Int. J. Cancer **110**, 417–423, 2004. [8](#)
- [71] M. Maclure, M. S. Bryant, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum
Decline of the hemoglobin adduct of 4-aminobiphenyl during withdrawal from smoking
Cancer Res. **50**, 181–184, 1990. [8](#), [30](#)
- [72] F. P. Perera, R. M. Santella, D. Brenner, M. C. Poirier, A. A. Munshi, H. K. Fischman, J. van Ryzin
DNA adducts, protein adducts, and sister chromatid exchange in cigarette smokers and non-smokers
J. Natl. Cancer Inst. **79**, 449–456, 1987. [8](#)

- [73] M. T. PinoriniGodly, S. R. Myers
HPLC and GC/MS determination of 4-aminobiphenyl haemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero
Toxicology **107**, 209–217, 1996. [8](#), [30](#)
- [74] P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, R. K. Ross, M. C. Yu
Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **12**, 503–507, 2003. [8](#)
- [75] D. Tang, D. Warburton, S. R. Tannenbaum, P. Skipper, R. M. Santella, G. S. Cerejido, F. G. Crawford, F. P. Perera
Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **8**, 427–431, 1999. [8](#), [30](#)
- [76] P. Vineis, N. Caporaso, S. R. Tannenbaum, P. L. Skipper, J. Glogowski, H. Bartsch, M. Coda, G. Talaska, F. Kadlubar
Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts, and cigarette-smoking
Cancer Res. **50**, 3002–3004, 1990. [8](#)
- [77] P. Vineis, H. Bartsch, N. Caporaso, A. M. Harrington, F. F. Kadlubar, M. T. Landi, C. Malaveille, P. G. Shields, P. Skipper, G. Talaska, S. R. Tannenbaum
Genetically based *N*-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens
Nature **369**, 154–156, 1994. [8](#)
- [78] A. Weston, N. E. Caporaso, K. Taghizadeh, R. N. Hoover, S. R. Tannenbaum, P. L. Skipper, J. H. Resau, B. F. Trump, C. C. Harris
Measurement of 4-aminobiphenyl-hemoglobin adducts in lung-cancer cases and controls
Cancer Res. **51**, 5219–5223, 1991. [8](#), [30](#)
- [79] L. A. Mooney, R. M. Santella, L. Covey, A. M. Jeffrey, W. Bigbee, M. C. Randall, T. B. Cooper, R. Ottman, W. Y. Tsai, L. Wazneh, A. H. Glassman, T. L. Young, F. P. Perera
Decline of DNA-damage and other biomarkers in peripheral-blood following smoking cessation
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **4**, 627–634, 1995. [8](#), [30](#)
- [80] H. G. Neumann, C. van Dorp, I. Zwirner-Baier
The implications for risk assessment of measuring the relative contribution to exposure from occupation, environment and lifestyle: Hemoglobin adducts from amino- and nitro-arenes
Toxicol. Lett. **82/83**, 771–778, 1995. [8](#)
- [81] L. El Marbouh, C. Arellano, C. Philibert, P. Evrard, J. Poey, G. Houin
Development and evaluation of an HPLC urinalysis screening test for occupational exposure to 3,4- and 3,5-dichloroanilines
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. **40**, 41–46, 2002. [8](#), [30](#), [131](#)
- [82] K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, J. Begerow
Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure
J. Chromatogr. B **755**, 215–228, 2001. [8](#), [27](#), [30](#), [131](#)
- [83] G. Sabbioni, J. F. Wei, Y. Y. Liu
Determination of hemoglobin adducts in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene
J. Chromatogr. B **682**, 243–248, 1996. [8](#), [30](#)

-
- [84] G. Sabbioni, A. Beyerbach
Haemoglobin adducts of aromatic amines: diamines and polyaromatic amines
J. Chromatogr. B **744**, 377–387, 2000. [8](#), [30](#)
- [85] C. J. Smith, G. L. Dooly, S. C. Moldoveanu
New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke
J. Chromatogr. A **991**, 99–107, 2003. [7](#), [33](#)
- [86] R. Stabbert, K. H. Schäfer, C. Biefel, K. Rustemeier
Analysis of aromatic amines in cigarette smoke
Rapid Commun. Mass Spectrom. **17**, 2125–2132, 2003. [7](#), [33](#)
- [87] G. Grimmer, D. Schneider, K. W. Naujack, G. Dettbarn, J. Jacob
Intercept-reactant method for the determination of aromatic amines in mainstream tobacco smoke
Beitr. Tabakforsch. **16**, 141–156, 1995. [7](#)
- [88] I. Schmeltz, D. Hoffmann
Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smoke
Chem. Rev. **77**, 295–311, 1977. [7](#)
- [89] R. P. Belardi, J. B. Pawliszyn
The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns
Water Pollut. Res. J. Can. **24**, 179–191, 1989. [9](#)
- [90] C. L. Arthur, J. Pawliszyn
Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers
Anal. Chem. **62**, 2145–2148, 1990. [9](#)
- [91] J. Pawliszyn
Solid-phase microextraction: theory and practice
Wiley-VCH, New York, 1997. [9](#), [21](#), [22](#), [26](#)
- [92] J. Pawliszyn (Hrsg.)
Applications of solid-phase microextraction
RSC, Cambridge, 1999. [9](#), [19](#), [178](#), [180](#)
- [93] S. A. Scheppers Wercinski (Hrsg.)
Solid-phase microextraction: a practical guide
Dekker, New York, 1999. [9](#)
- [94] R. Eisert, K. Levsen
Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water
J. Chromatogr. A **733**, 143–157, 1996. [9](#)
- [95] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé
Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples
Trends Anal. Chem. **18**, 557–568, 1999. [9](#)
- [96] H. Lord, J. Pawliszyn
Evolution of solid-phase microextraction technology
J. Chromatogr. A **885**, 153–193, 2000. [9](#)

- [97] S. Ulrich
Solid-phase microextraction in biomedical analysis
J. Chromatogr. A **902**, 167–194, 2000. [9](#), [178](#)
- [98] G. A. Mills, V. Walker
Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials
J. Chromatogr. A **902**, 267–287, 2000. [9](#)
- [99] H. Lord, J. Pawliszyn
Microextraction of drugs
J. Chromatogr. A **902**, 17–63, 2000. [9](#), [111](#)
- [100] G. Theodoridis, E. H. M. Koster, G. J. de Jong
Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples
J. Chromatogr. B **745**, 49–82, 2000. [9](#)
- [101] H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn
Applications of solid-phase microextraction in food analysis
J. Chromatogr. A **880**, 35–62, 2000. [9](#), [18](#), [19](#)
- [102] N. H. Snow
Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices
J. Chromatogr. A **885**, 445–455, 2000. [9](#)
- [103] H. Kataoka
Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application - a review
Anal. Bioanal. Chem. **373**, 31–45, 2002. [9](#), [11](#)
- [104] J. Chen, J. B. Pawliszyn
Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid-chromatography
Anal. Chem. **67**, 2530–2533, 1995. [10](#)
- [105] C. W. Whang, J. Pawliszyn
Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis
Anal. Commun. **35**, 353–356, 1998. [10](#)
- [106] Z. Zhang, J. Pawliszyn
Headspace solid-phase microextraction
Anal. Chem. **65**, 1843–1852, 1993. [10](#), [14](#)
- [107] M. Abdel-Rehim, G. Carlsson, M. Bielenstein, T. Arvidsson, L. G. Blomberg
Evaluation of solid-phase microextraction for the study of protein binding in human plasma samples
J. Chromatogr. Sci. **38**, 458–464, 2000. [10](#), [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [108] E. H. M. Koster, C. Wemes, J. B. Morsink, G. J. de Jong
Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography
J. Chromatogr. B **739**, 175–182, 2000. [10](#), [29](#)
- [109] *SPME Applications Guide*
Sigma-Aldrich, 2. Auflage, 2000. [10](#)

-
- [110] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers
Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles
J. Microcol. Sep. **11**, 737–747, 1999. [10](#)
- [111] R. Eisert, J. Pawliszyn
Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography
Anal. Chem. **69**, 3140–3147, 1997. [11](#)
- [112] J. Lipinski
Automated solid phase dynamic extraction - Extraction of organics using a wall coated syringe needle
Fresenius J. Anal. Chem. **369**, 57–62, 2001. [11](#)
- [113] M. A. Jeannot, F. F. Cantwell
Solvent microextraction into a single drop
Anal. Chem. **68**, 2236–2240, 1996. [11](#)
- [114] E. Psillakis, N. Kalogerakis
Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples
J. Chromatogr. A **938**, 113–120, 2001. [11](#)
- [115] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn
Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers
Anal. Chem. **64**, 1187–1199, 1992. [13](#)
- [116] J. Pörschmann, F. D. Kopinke, J. Pawliszyn
Solid-phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter
J. Chromatogr. A **816**, 159–167, 1998. [15](#)
- [117] E. U. Ramos, S. N. Meijer, W. H. J. Vaes, H. J. M. Verhaar, J. L. M. Hermens
Using solid-phase microextraction to determine partition coefficients to humic acids and bioavailable concentrations of hydrophobic chemicals
Environ. Sci. Technol. **32**, 3430–3435, 1998. [15](#)
- [118] J. K. Seydel, K. J. Schaper
Quantitative structure-pharmacokinetic relationships and drug design
Pharmacol. Ther. **15**, 131–182, 1981. [15](#)
- [119] J. Oravcová, B. Böhs, W. Lindner
Drug-protein binding studies - New trends in analytical and experimental methodology
J. Chromatogr. B **677**, 1–28, 1996. [15](#)
- [120] W. H. J. Vaes, E. U. Ramos, H. J. M. Verhaar, W. Seinen, J. L. M. Hermens
Measurement of the free concentration using solid-phase microextraction: Binding to protein
Anal. Chem. **68**, 4463–4467, 1996. [15](#), [86](#)
- [121] C. G. Zambonin, A. Aresta
SPME-LC with UV detection to study delorazepam-serum albumin interactions
J. Pharm. Biomed. Anal. **29**, 895–900, 2002. [15](#)

- [122] E. Artola-Garicano, W. H. J. Vaes, J. L. M. Hermens
Validation of negligible depletion solid-phase microextraction as a tool to determine tissue/blood partition coefficients for semivolatile and nonvolatile organic chemicals
Toxicol. Appl. Pharmacol. **166**, 138–144, 2000. 15
- [123] W. H. J. Vaes, E. U. Ramos, C. Hamwijk, I. van Holsteijn, B. J. Blaauboer, W. Seinen, H. J. M. Verhaar, J. L. M. Hermens
Solid phase microextraction as a tool to determine membrane/water partition coefficients and bioavailable concentrations in *in vitro* systems
Chem. Res. Toxicol. **10**, 1067–1072, 1997. 15
- [124] B. I. Escher, M. Berg, J. Mühlemann, M. A. A. Schwarz, J. L. M. Hermens, W. H. J. Vaes, R. P. Schwarzenbach
Determination of liposome/water partition coefficients of organic acids and bases by solid-phase microextraction
Analyst **127**, 42–48, 2002. 15, 86
- [125] H. C. H. Lützhøft, W. H. J. Vaes, A. P. Freidig, B. Halling-Sørensen, J. L. M. Hermens
Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by negligible-depletion-SSPME-HPLC
Environ. Sci. Technol. **34**, 4989–4994, 2000. 15
- [126] H. D. Yuan, R. Ranatung, P. W. Carr, J. Pawliszyn
Determination of equilibrium constant of alkylbenzenes binding to bovine serum albumin by solid phase microextraction
Analyst **124**, 1443–1448, 1999. 15
- [127] H. D. Yuan, J. Pawliszyn
Application of solid-phase microextraction in the determination of diazepam binding to human serum albumin
Anal. Chem. **73**, 4410–4416, 2001. 15
- [128] H. A. Leslie, A. J. P. Oosthoek, F. J. M. Busser, M. H. S. Kraak, J. L. M. Hermens
Biomimetic solid-phase microextraction to predict body residues and toxicity of chemicals that act by narcosis
Environ. Toxicol. Chem. **21**, 229–234, 2002. 15
- [129] T. F. Parkerton, M. A. Stone, D. J. Letinski
Assessing the aquatic toxicity of complex hydrocarbon mixtures using solid phase microextraction
Toxicol. Lett. **112**, 273–282, 2000. 15
- [130] E. M. J. Verbruggen, W. H. J. Vaes, T. F. Parkerton, J. L. M. Hermens
Polyacrylate coated SPME fibers as a tool to simulate body residues and target concentrations of complex organic mixtures for estimation of baseline toxicity
Environ. Sci. Technol. **34**, 324–331, 2000. 15, 16
- [131] C. H. Hansch, A. Leo, D. Hoekman
Exploring QSAR
American Chemical Society, Washington, 1995. 15, 67
- [132] W. M. Meylan, P. H. Howard, R. S. Boethling, D. Aronson, H. Printup, S. Gouchie
Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient
Environ. Toxicol. Chem. **18**, 664–672, 1999. 15

-
- [133] D. Mackay, A. Fraser
Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models
Environ. Pollut. **110**, 375–391, 2000. 15
- [134] H. I. Zeliger
Toxic effects of chemical mixtures
Arch. Environ. Health **58**, 23–29, 2003. 15
- [135] J. R. Dean, W. R. Tomlinson, V. Makovskaya, R. Cumming, M. Hetheridge, M. Comber
Solid-phase microextraction as a method for estimating the octanol-water partition coefficient
Anal. Chem. **68**, 130–133, 1996. 16
- [136] R. A. Doong, S. M. Chang
Determination of distribution coefficients of priority polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase microextraction
Anal. Chem. **72**, 3647–3652, 2000. 16, 55, 57, 183
- [137] I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J. C. Moltó, G. Font
SPME of 52 pesticides and polychlorinated biphenyls: Extraction efficiencies of the SPME coatings poly(dimethylsiloxane), polyacrylate, poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene, carboxen-poly(dimethylsiloxane), and carbowax-divinylbenzene
J. Sep. Sci. **24**, 39–48, 2001. 16, 72, 213
- [138] A. Paschke, R. Popp
Solid-phase microextraction fibre-water distribution constants of more hydrophobic organic compounds and their correlations with octanol-water partition coefficients
J. Chromatogr. A **999**, 35–42, 2003. 16, 85
- [139] J. Dugay, C. Miège, M. C. Hennion
Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water
J. Chromatogr. A **795**, 27–42, 1998. 16, 62, 72, 180, 213
- [140] R. Eisert, K. Levsen
Determination of organophosphorus, triazine and 2,6-dinitroaniline pesticides in aqueous samples via solid-phase microextraction (SPME) and gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection
Fresenius J. Anal. Chem. **351**, 555–562, 1995. 16, 62, 72
- [141] R. L. Grob (Ed.)
Modern practice of gas chromatography
Wiley, New York, 3, 1995. 16
- [142] K. Grob
Split and splitless injection for quantitative gas chromatography: concepts, processes, practical guidelines, sources of error
Wiley-VCH, Weinheim, 4, 2001. 16, 80
- [143] L. Urruty, M. Montury
Extracted amounts by solid-phase microextraction: A realistic approach to the partition coefficient K
J. Chromatogr. Sci. **37**, 277–282, 1999. 16

- [144] L. Tuduri, V. Desauziers, J. L. Fanlo
Determination of absolute amount extracted by solid-phase microextraction: Different approaches under examination
J. Microcolumn Sep. **12**, 550–557, 2000. 16
- [145] C. L. Arthur, L. M. Killam, K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, J. R. Berg
Automation and optimization of solid-phase microextraction
Anal. Chem. **64**, 1960–1966, 1992. 16
- [146] L. Nardi
Determination of siloxane-water partition coefficients by capillary extraction-high-resolution gas chromatography - Study of aromatic solvents
J. Chromatogr. A **985**, 39–45, 2003. 16
- [147] T. Górecki, X. M. Yu, J. Pawliszyn
Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres
Analyst **124**, 643–649, 1999. 19, 20
- [148] S. N. Semenov, J. A. Koziel, J. Pawliszyn
Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm
J. Chromatogr. A **873**, 39–51, 2000. 20
- [149] H. Kelz
Festphasenmikroextraktion aromatischer Amine
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 1999. 20, 21, 37, 39, 110, 165, 176, 177, 183, 206
- [150] Y. Yang, D. J. Miller, S. B. Hawthorne
Solid-phase microextraction of polychlorinated biphenyls
J. Chromatogr. A **800**, 257–266, 1998. 20, 55, 57, 62, 183
- [151] A. H. Ackerman, R. J. Hurtubise
The effects of adsorption of solutes on glassware and teflon in the calculation of partition coefficients for solid-phase microextraction with 1PS paper
Talanta **52**, 853–861, 2000. 20
- [152] S. Motlagh, J. Pawliszyn
Online monitoring of flowing samples using solid-phase microextraction gas-chromatography
Anal. Chim. Acta **284**, 265–273, 1993. 21
- [153] R. Eisert, J. Pawliszyn
Design of automated solid-phase microextraction for the analysis of organic compounds in aqueous samples
J. Chromatogr. A **776**, 293–303, 1997. 21
- [154] H. Geppert
Solid-phase microextraction with rotation of the microfiber
Anal. Chem. **70**, 3981–3982, 1998. 21
- [155] T. Zimmermann
Neue Verfahren zur Anreicherung und Bestimmung von Pestiziden aus Trinkwasser
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2000. 21, 176

- [156] T. Górecki, A. Khaled, J. Pawliszyn
The effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction - Part 2. Experimental verification
Analyst **123**, 2819–2824, 1998. [22](#), [175](#)
- [157] T. Górecki, J. Pawliszyn
Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction - 1. Theoretical considerations
Analyst **122**, 1079–1086, 1997. [23](#)
- [158] J. Ai
Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations
Anal. Chem. **69**, 1230–1236, 1997. [23](#), [85](#), [106](#)
- [159] T. Watanabe, A. Namera, M. Yashiki, Y. Iwasaki, T. Kojima
Simple analysis of local anaesthetics in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas-chromatography-mass spectrometry-electron impact ionization selected ion monitoring
J. Chromatogr. B **709**, 225–232, 1998. [25](#), [109](#)
- [160] R. M. Riggan, T. F. Cole, S. Billets
Determination of aniline and substituted derivatives in wastewater by gas and liquid chromatography
Anal. Chem. **55**, 1862–1869, 1983. [27](#), [31](#), [32](#)
- [161] B. Scholz, N. Palauschek
The determination of substituted aromatic amines in water and sediment samples
Fresenius J. Anal. Chem. **331**, 282–289, 1988. [27](#), [31](#), [32](#)
- [162] J. Tekel', K. Schultzová, J. Kovačičová, E. Brandšterová
Capillary GC with nitrogen-selective detection for on-line analysis of substituted anilines formed from phenylurea herbicides
J. High Resol. Chromatogr. **16**, 126–128, 1993. [27](#), [31](#), [32](#)
- [163] T. Okumura, K. Imamura, Y. Nishikawa
Determination of anilines in river water, sediment, and fish samples by gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. Sci. **34**, 190–198, 1996. [27](#), [31](#), [32](#)
- [164] F. I. Onuska, K. A. Terry, R. J. Maguire
Analysis of aromatic amines in industrial wastewater by capillary gas chromatography-mass spectrometry
Water Qual. Res. J. Canada **35**, 245–261, 2000. [27](#), [31](#), [32](#)
- [165] 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**, 153–166, 1993. [27](#), [31](#), [32](#)
- [166] T. S. Oostdyk, 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 **A29**, 1607–1628, 1994. [27](#), [28](#), [31](#), [32](#), [223](#)

- [167] P. Mußmann, R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch Determination of nitrophenols, diaminitoluenes, and chloroaromatics in ammunition wastewater
Acta Hydrochim. Hydrobiol. **23**, 13–19, 1995. 27, 28, 31, 32
- [168] U. Lewin, L. Wennrich, J. Efer, W. Engewald
Determination of highly polar compounds in water samples around former ammunition plants
Chromatographia **45**, 91–98, 1997. 27, 28, 180
- [169] J. Norberg, Å. Zander, J. Å. Jönsson
Fully automated on-line supported liquid membrane liquid chromatographic determination of aniline derivatives in environmental waters
Chromatographia **46**, 483–488, 1997. 27, 31
- [170] J. F. Jen, C. T. Chang, T. C. Yang
On-line microdialysis-high-performance liquid chromatographic determination of aniline and 2-chloroaniline in polymer industrial wastewater
J. Chromatogr. A **930**, 119–125, 2001. 27, 31
- [171] L. M. Zhao, L. Y. Zhu, H. K. Lee
Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid- liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. A **963**, 239–248, 2002. 27, 31
- [172] Q. X. Zhou, G. B. Jiang, J. F. Liu, Y. Q. Cai
Combination of microporous membrane liquid-liquid extraction and capillary electrophoresis for the analysis of aromatic amines in water samples
Anal. Chim. Acta **509**, 55–62, 2004. 27, 32
- [173] X. Guo, S. Mitra
On-line membrane extraction liquid chromatography for monitoring semi-volatile organics in aqueous matrices
J. Chromatogr. A **904**, 189–196, 2000. 27, 31
- [174] 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**, 173–182, 1998. 27, 36, 37, 223
- [175] 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**, 161–172, 1998. 27, 36, 37, 39, 65, 165, 169
- [176] 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
Int. J. Environ. Anal. Chem. **74**, 25–41, 1999. 27, 35, 36
- [177] M. Leß
Bestimmung aromatischer Amine mit On-line-SPE/HPLC sowie mit GC/ECD nach Derivatisierung
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2001. 27, 28, 34, 44

-
- [178] B. Gawdzik, T. Matynia
Use of porous polymers in off-line preconcentration of nitrobenzenes and their reduction products from water
J. Chromatogr. A **733**, 491–496, 1996. 27, 28, 31
- [179] A. Cavallaro, V. Piangerelli, F. Nerini, S. Cavalli, C. Reschiotto
Selective determination of aromatic-amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction
J. Chromatogr. A **709**, 361–366, 1995. 27, 32
- [180] H. Börnick, T. Grischek, E. Worch
Determination of aromatic amines in surface waters and comparison of their behavior in HPLC and on sediment columns
Fresenius J. Anal. Chem. **371**, 607–613, 2001. 27, 31
- [181] S. Lacorte, M. C. Perrot, D. Fraisse, D. Barceló
Determination of chlorobenzidines, in industrial effluent by solid-phase extraction and liquid chromatography with electrochemical and mass spectrometric detection
J. Chromatogr. A **833**, 181–194, 1999. 27, 31
- [182] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraisse, D. Barceló
Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS
Anal. Chem. **72**, 1430–1440, 2000. 27, 28, 31, 32, 180, 223
- [183] J. Kruppa, A. Preiß, K. Levsen, H. P. Kabus
Off-line and on-line extraction of explosives and related compounds from aqueous samples using solid sorbents
Acta Hydrochim. Hydrobiol. **24**, 226–231, 1996. 27, 28, 31
- [184] V. Piangerelli, F. Nerini, S. Cavalli
Determination of aromatic amines and phenols in environmental samples by selective SPE elution and HPLC with amperometric detection
Ann. Chim. **87**, 571–582, 1997. 27, 31
- [185] S. Lenz, F. Sacher, H. J. Brauch, B. Hambsch
Development of analytical methods for the determination of genotoxic compounds in water
Vom Wasser **91**, 47–60, 1998. 27, 31, 32
- [186] C. Brede, I. Skjevraak, H. Herikstad
Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry
J. Chromatogr. A **983**, 35–42, 2003. 27, 35
- [187] A. Golloch, J. Hagen, K. Orth
Aromatische Amine in Wässern
LaborPraxis 58–63, 1995. 27
- [188] S. L. Zhao, F. S. Wei, H. F. Zou, X. B. Xu
Determination of arylamine compounds in waste water using solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography
Chemosphere **36**, 73–78, 1998. 27, 31

- [189] W. C. Brumley, C. M. Brownrigg
Applications of MEKC in the determination of benzidines following extraction from water, soil, sediment, and chromatographic adsorbents
J. Chromatogr. Sci. **32**, 69–75, 1994. 27, 32
- [190] G. Böer, C. Schlett, H. P. Thier
Gas-chromatographic determination of substituted anilines in water after solid-phase extraction
Z. Wasser- Abwasser-Forsch. **23**, 220–223, 1990. 27, 31, 32
- [191] R. J. G. Jeevan, M. Bhaskar, R. Chandrasekar, G. Radhakrishnan
Analysis of arylamine isomers by micellar electrokinetic chromatography
Electrophoresis **23**, 584–590, 2002. 27, 28, 32
- [192] M. W. F. Nielen, R. W. Frei, U. A. Th. Brinkman
Use of cation exchangers for the on-line preconcentration of polar anilines in liquid chromatography
J. Chromatogr. **317**, 557–567, 1984. 27, 28, 31
- [193] M. Bouzige, G. Machtalère, P. Legeay, V. Pichon, M. C. Hennion
New methodology for a selective on-line monitoring of some polar priority industrial chemicals in waste water
Waste Manage. **19**, 171–180, 1999. 27, 28, 31
- [194] A. Di Corcia, R. Samperi
Determination of chloroaniline traces in environmental waters by selective extraction with two traps in tandem and liquid chromatography
Anal. Chem. **62**, 1490–1494, 1990. 27, 31
- [195] A. Di Corcia, A. Costantino, C. Crescenzi, R. Samperi
Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters
J. Chromatogr. A **852**, 465–474, 1999. 27, 31
- [196] J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou
Development of an automated on-line solid-phase extraction - high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices
J. Chromatogr. A **904**, 171–188, 2000. 28, 31, 180
- [197] M. Bhaskar, P. Aruna, R. J. G. Jeevan, G. Radhakrishnan
 β -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines
Anal. Chim. Acta **509**, 39–45, 2004. 28, 31
- [198] A. Zapf, R. Heyer, H. J. Stan
Rapid liquid-liquid extraction method for trace analysis of organic contaminants in drinking water
J. Chromatogr. A **694**, 453–461, 1995. 28, 29, 31, 32
- [199] T. Welsch, H. Block
Separation and enrichment of traces of explosives and their by-products from water by multiple micro liquid extraction for their determination by capillary gas chromatography
Fresenius J. Anal. Chem. **357**, 904–908, 1997. 28, 31, 32

- [200] L. Y. Zhu, C. B. Tay, H. K. Lee
Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. A **963**, 231–237, 2002. 28, 29, 31
- [201] R. J. J. Vreuls, E. Romijn, U. A. T. Brinkman
In-vial liquid-liquid extraction with subsequent large-volume on-column injection into GC-MS for the determination of anilines in tap, surface, and wastewater
J. Microcol. Sep. **10**, 581–588, 1998. 28, 29, 31, 32
- [202] 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**, 488–493, 1991. 28, 31
- [203] L. E. Vera-Avila, A. García-Ac, R. Covarrubias-Herrera
Trace-level determination of benzidine and 3,3'-dichlorobenzidine in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction and liquid chromatography with electrochemical detection
J. Chromatogr. Sci. **39**, 301–307, 2001. 28, 31
- [204] A. Fromberg, T. Nilsson, B. R. Larsen, L. Montanarella, S. Facchetti, J. Ø. Madsen
Analysis of chloro- and nitroanilines and -benzenes in soils by headspace solid-phase microextraction
J. Chromatogr. A **746**, 71–81, 1996. 28, 29, 31, 32, 86
- [205] S. Paul, D. Lienig, E. Worch
Anwendung der Mikrofestphasenextraktion zur Anreicherung ausgewählter aromatischer Amine aus Oberflächenwasser
Vom Wasser **88**, 273–283, 1997. 28, 29, 31, 32, 196, 223
- [206] L. Müller, E. Fattore, E. Benfenati
Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry in water samples
J. Chromatogr. A **791**, 221–230, 1997. 28, 29, 30, 31, 32, 196, 223
- [207] S. D. Huang, C. P. Cheng, Y. H. Sung
Determination of benzene derivatives in water by solid-phase microextraction
Anal. Chim. Acta **343**, 101–108, 1997. 28, 29, 31, 32, 196
- [208] L. S. DeBruin, P. D. Josephy, J. B. Pawliszyn
Solid-phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids
Anal. Chem. **70**, 1986–1992, 1998. 28, 29, 30, 31, 32
- [209] S. A. Barshick, W. H. Griest
Trace analysis of explosives in seawater using solid-phase microextraction and gas chromatography ion trap mass spectrometry
Anal. Chem. **70**, 3015–3020, 1998. 28, 29, 31, 32, 223
- [210] H. van Doorn, C. B. Grabanski, D. J. Miller, S. B. Hawthorne
Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water
J. Chromatogr. A **829**, 223–233, 1998. 28, 29, 31, 32, 176, 223

- [211] F. Y. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori, O. Suzuki
Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water
J. Chromatogr. B **714**, 205–213, 1998. [28](#), [29](#), [30](#), [31](#), [32](#)
- [212] Y. C. Wu, S. D. Huang
Solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of aromatic amines
Anal. Chem. **71**, 310–318, 1999. [28](#), [29](#), [31](#), [223](#)
- [213] Z. R. Zeng, W. L. Qiu, M. Yang, X. Wei, Z. F. Huang, F. Li
Solid-phase microextraction of monocyclic aromatic amines using novel fibers coated with crown ether
J. Chromatogr. A **934**, 51–57, 2001. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [214] A. Weisz, D. Andrzejewski
Identification of 2-bromo-3,4,5,6-tetrachloroaniline and its quantification in the color additives D&C Red Nos. 27 and 28 (phloxine B) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. A **1005**, 143–153, 2003. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [215] A. Weisz, D. Andrzejewski, R. R. Rasooly
Determination of 2,4,6-tribromoaniline in the color additives D&C Red Nos. 21 and 22 (Eosin Y) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. A **1057**, 185–191, 2004. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [216] W. Y. Chang, Y. H. Sung, S. D. Huang
Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography
Anal. Chim. Acta **495**, 109–122, 2003. [28](#), [29](#), [31](#)
- [217] W. Wang, S. L. Gong, Q. H. Cao, Y. Y. Chen, X. J. Li, Z. R. Zeng
Solid-phase microextraction of aromatic amines with an amide bridged calix[4]arene coated fiber
Chromatographia **61**, 75–80, 2005. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [218] M. J. Huang, C. Tai, Q. F. Zhou, G. B. Jiang
Preparation of polyaniline coating on a stainless-steel wire using electroplating and its application to the determination of six aromatic amines using headspace solid-phase microextraction
J. Chromatogr. A **1048**, 257–262, 2004. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [219] H. X. Yu, L. Dong, C. Y. Wu, L. Wu, J. Xing
Hydroxyfullerene as a novel coating for solid-phase microextraction fiber with sol-gel technology
J. Chromatogr. A **978**, 37–48, 2002. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [220] H. Berrada, G. Font, J. C. Moltó
Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables
J. Chromatogr. A **1042**, 9–14, 2004. [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)
- [221] P. Brunmark, P. Persson, G. Skarping
Determination of 4,4'-methylenedianiline in hydrolysed human urine by micro liquid chromatography with ultraviolet detection
J. Chromatogr. **579**, 350–354, 1992. [30](#)

- [222] J. Jodynis-Liebert, H. H. Bennisir
Gas chromatographic method for the determination of toluidines in spiked urine samples
J. Chromatogr. B **738**, 427–430, 2000. 30, 33
- [223] G. Sabbioni, D. Schütze
Hemoglobin binding of bicyclic aromatic amines
Chem. Res. Toxicol. **11**, 471–483, 1998. 30
- [224] G. Sabbioni, A. Beyerbach
Haemoglobin adducts of aromatic amines: diamines and polyaromatic amines
J. Chromatogr. B **744**, 377–387, 2000. 30, 33
- [225] I. R. DeLeon, N. J. Brown, J. P. Cocchiara, S. G. Cruz, J. L. Laseter
Trace analysis of 2,6-disubstituted anilines in blood by capillary gas chromatography
J. Anal. Toxicol. **7**, 185–187, 1983. 30
- [226] M. J. Avery
Determination of aromatic amines in urine and serum
J. Chromatogr. **488**, 470–475, 1989. 30
- [227] H. Shintani
Solid-phase extraction of a carcinogen, 4,4'-methylenedianiline, in serum
J. Anal. Toxicol. **15**, 198–201, 1991. 30
- [228] M. Abdel-Rehim, M. Bielenstein, Y. Askemark, N. Tyrefors, T. Arvidsson
High-performance liquid chromatography-tandem electrospray mass spectrometry for the determination of lidocaine and its metabolites in human plasma and urine
J. Chromatogr. B **741**, 175–188, 2000. 30
- [229] J. P. Quirino, Y. Iwai, K. Otsuka, S. Terabe
Determination of environmentally relevant aromatic amines in the ppt levels by cation selective exhaustive injection- sweeping-micellar electrokinetic chromatography
Electrophoresis **21**, 2899–2903, 2000. 30, 32
- [230] J. P. Quirino, S. Terabe
Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: Cation- selective exhaustive injection and sweeping
Anal. Chem. **72**, 1023–1030, 2000. 30
- [231] K. Isoo, K. Otsuka, S. Terabe
Application of sweeping to micellar electrokinetic chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of environmental pollutants
Electrophoresis **22**, 3426–3432, 2001. 30, 32
- [232] X. N. Cao, J. H. Li, H. H. Xu, J. R. Zhan, L. Lin, K. Yamamoto, L. T. Jin
Simultaneous determination of aromatic amines by liquid chromatography coupled with carbon nanotubes/poly (3-methylthiophene) modified dual-electrode
Chromatographia **59**, 167–172, 2004. 31
- [233] 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**, 161–167, 1996. 31

- [234] K. Spiegel, T. Welsch
Monitoring degradation processes of explosives by HPLC analysis with UV and amperometric detection
Fresenius J. Anal. Chem. **357**, 333–337, 1997. [31](#)
- [235] 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**, 319–325, 1996. [31](#)
- [236] M. C. Gennaro, E. Marengo, V. Gianotti, S. Angioi
Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of mono-, di- and trichloroanilines through a gradient elution optimised by experimental design
J. Chromatogr. A **945**, 287–292, 2002. [31](#)
- [237] R. Delépée, P. Chaimbault, J. P. Antignac, M. Lafosse
Validation of a real-time monitoring method for aniline in freshwater by high-performance liquid chromatography on porous graphitic carbon/electrospray ionization tandem mass spectrometry
Rapid Commun. Mass Spectrom. **18**, 1548–1552, 2004. [31](#)
- [238] P. D. Unger, M. A. Friedman
High-performance liquid-chromatography of 2,6-diaminotoluene and 2,4-diaminotoluene, and its application to the determination of 2,4-diaminotoluene in urine and plasma
J. Chromatogr. **174**, 379–384, 1979. [31](#)
- [239] H. Kataoka
Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis
J. Chromatogr. A **733**, 19–34, 1996. [31](#), [32](#), [33](#)
- [240] C. T. Yan, J. F. Jen
Determination of aniline in water by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography
Chromatographia **59**, 517–520, 2004. [31](#), [32](#)
- [241] F. Cioni, G. Bartolucci, G. Pieraccini, S. Meloni, G. Moneti
Development of a solid phase microextraction method for detection of the use of banned azo dyes in coloured textiles and leather
Rapid Commun. Mass Spectrom. **13**, 1833–1837, 1999. [31](#), [32](#)
- [242] T. S. Oostdyk, R. L. Grob, J. L. Snyder, M. E. McNally
Study of sonication and supercritical fluid extraction of primary aromatic amines
Anal. Chem. **65**, 596–600, 1993. [31](#), [32](#)
- [243] X. J. Huang, T. Y. You, T. Li, X. R. Yang, E. K. Wang
End-column electrochemical detection for aromatic amines with high performance capillary electrophoresis
Electroanalysis **11**, 969–972, 1999. [32](#)
- [244] S. Shin Ho, J. Heon Lee, S. Ahn Hye, S. Shin Ueon
New sensitive determination method of benzidine-hemoglobin adducts by gas chromatography-electron impact mass spectrometry
J. Chromatogr. B **783**, 125–132, 2003. [32](#), [34](#)

- [245] G. Skarping, L. Renman, M. Dalene
Trace analysis of amines and isocyanates using glass-capillary gas-chromatography and selective detection. 2. Determination of aromatic amines as perfluorofatty acid-amides using nitrogen-selective detection
J. Chromatogr. **270**, 207–218, 1983. [33](#)
- [246] R. J. Turesky, J. P. Freeman, R. D. Holland, D. M. Nestorick, D. W. Miller, D. L. Ratnasinghe, F. F. Kadlubar
Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes
Chem. Res. Toxicol. **16**, 1162–1173, 2003. [33](#)
- [247] M. Longo, A. Cavallaro
Determination of aromatic amines at trace levels by derivatization with heptafluorobutyric anhydride and gas chromatography electron-capture negative-ion chemical ionization mass spectrometry
J. Chromatogr. A **753**, 91–100, 1996. [33](#)
- [248] L. J. Felice
Determination of alkyl anilines and alkyl pyridines in solvent refined coal distillates and aqueous extracts by gas chromatography/mass spectrometry
Anal. Chem. **54**, 869–872, 1982. [33](#)
- [249] R. T. Coutts, E. E. Hargesheimer, F. M. Pasutto, G. B. Baker
Analysis of aniline and aminophenols in aqueous solutions using electron capture gas chromatography
J. Chromatogr. Sci. **19**, 151–155, 1981. [33](#), [34](#), [207](#)
- [250] B. A. Tomkins, C. H. Ho
Determination of polycyclic aromatic amines in natural and synthetic crudes
Anal. Chem. **54**, 91–96, 1982. [33](#)
- [251] K. Schoene, H. J. Bruckert, J. Steinhanses, A. König
Two stage derivatization with N-(*tert.*-butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) and N-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (MBTFA) for the gas-chromatographic analysis of OH-, SH- and NH-compounds
Fresenius J. Anal. Chem. **348**, 364–370, 1994. [34](#)
- [252] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K. K. Verma
Simultaneous determination of ammonia, aliphatic amines, aromatic amines and phenols at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels in environmental waters by solid-phase extraction of their benzoyl derivatives and gas chromatography-mass spectrometry
Analyst **126**, 1663–1668, 2001. [34](#)
- [253] K. Kijima, H. Kataoka, M. Makita
Determination of aromatic amines as their N-dimethylthiophosphoryl derivatives by gas chromatography with flame photometric detection
J. Chromatogr. A **738**, 83–90, 1996. [34](#)
- [254] A. Dasgupta
Gas chromatographic mass spectrometric identification and quantification of aniline after extraction from serum and derivatization with 2,2,2-trichloroethyl chloroformate, a novel derivative
J. Chromatogr. B **716**, 354–358, 1998. [34](#)

- [255] S. Angelino, V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, M. Vincenti
Improved procedure for *n*-hexyl chloroformate-mediated derivatization of highly hydrophilic substances directly in water : hydroxyaminoic compounds
J. Chromatogr. A **793**, 307–316, 1998. 34, 207
- [256] J. Franc, V. Koudelková
Thin-layer chromatography of aromatic amines and their derivatives after reactions with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene
J. Chromatogr. **170**, 89–97, 1979. 34
- [257] S. Nakatsuji, R. Nakano, M. Kawano, K. Nakashima, S. Akiyama
5-(*p*-Dimethylaminophenyl)-2,4-pentadienal as an analytical reagent: a simple preparation of the reagent and its application to the colorimetric determination of primary aromatic amines
Chem. Pharm. Bull. **30**, 2467–2473, 1982. 34
- [258] R. B. Geerdink
Determination of aniline derivatives by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection
J. Chromatogr. **445**, 273–281, 1988. 35
- [259] D. Djozan, M. A. Farajzadeh
Liquid-chromatographic determination of aniline and derivatives in environmental waters at nanogram per liter levels using fluorescamine precolumn derivatization
Chromatographia **41**, 568–572, 1995. 35
- [260] A. Dworschak
Einsatzmöglichkeiten der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2000. 35, 44
- [261] W. Wall, K. Chan, Z. El Rassi
Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites: VI. Surfactant-mediated electrokinetic capillary chromatography of aniline pesticidic metabolites derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate and their detection by laser-induced fluorescence
Electrophoresis **22**, 2320–2326, 2001. 35
- [262] A. Asthana, D. Bose, A. Durgbanshi, S. K. Sanghi, W. T. Kok
Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection
J. Chromatogr. A **895**, 197–203, 2000. 35
- [263] M. Kim, J. T. Stewart
HPLC post column derivatization of aromatic amines using *N*-methyl-9-chloroacridinium triflate
Mikrochim. Acta **3**, 221–232, 1990. 35
- [264] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler
Derivatization of amines in solid-phase extraction supports with 9-fluorenylmethyl chloroformate for liquid chromatography
Anal. Chim. Acta **344**, 125–136, 1997. 35
- [265] W. Wall, Z. El Rassi
Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites: V. Micellar electrokinetic capillary chromatography of aniline pesticidic metabolites derivatized with fluorescein isothiocyanate and their detection in real water at low levels by laser-induced fluorescence
Electrophoresis **22**, 2312–2319, 2001. 35

-
- [266] T. C. Schmidt, M. Petersmann, L. Kaminski, E. von Löw, G. Stork
Analysis of aminobenzoic acids in waste water from a former ammunition plant with HPLC and combined diode array and fluorescence detection
Fresenius J. Anal. Chem. **357**, 121–126, 1997. 35
- [267] T. C. Schmidt, R. Haas, E. von Löw, K. Steinbach
Derivatization of aromatic amines with bromine for improved gas chromatographic determination
Chromatographia **48**, 436–442, 1998. 35
- [268] E. Reitermayer
Identifizierung und Bestimmung von aromatischen Aminen in Wasserproben aus dem Bereich einer Rüstungsalllast mit Hilfe der HPLC
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 1991. 35, 61, 206
- [269] M. Petersmann
Untersuchung von Wasserproben aus dem Bereich einer Rüstungsalllast auf polare aromatische Amine mit Hilfe der HPLC nach Extraktion an Festphasen
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 1995. 35, 61, 206
- [270] U. Volkwein
Analyse von aromatischen Aminen mit HPLC-DAD und HPLC-MS
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, 1997. 35, 61, 206
- [271] R. Haas, T. C. Schmidt, K. Steinbach, E. von Löw
Derivatization of aromatic amines for analysis in ammunition wastewater. 2. Derivatization of methyl anilines by iodination with a Sandmeyer-like reaction
Fresenius J. Anal. Chem. **359**, 497–501, 1997. 36, 37, 45, 165, 169
- [272] S. Pötz
Qualitative Bestimmung aromatischer Amine im Urin mittels GC/AED und GC/MS nach Derivatisierung und Anreicherung durch Festphasenmikroextraktion (SPME)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2002. 38
- [273] G. Jander, E. Blasius
Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie
S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 13. Auflage, 1960. 41
- [274] *Herstellung von Diazoniumsalzen durch Diazotieren aromatischer Amine*
in: E. Müller
Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 10/3, Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1960. 42, 54
- [275] *Preparation of diazonium groups*
in: S. Patai
The chemistry of functional groups, Band „The chemistry of diazonium and diazo groups“, Wiley, Chichester, 1978. 42, 54
- [276] H. H. Hodgson
The Sandmeyer reaction
Chem. Rev. **40**, 251–277, 1947. 42, 43
- [277] E. Pfeil
Theorie und Praxis der Sandmeyerschen Reaktion
Angew. Chem. **65**, 155–158, 1953. 43

- [278] *Sandmeyersche Reaktion*
in: E. Müller
Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 5/4, Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1960. 43
- [279] *Organikum*
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 18. Auflage, 1990. 43, 152
- [280] K. H. Saunders, R. L. Allen
The aromatic diazo compounds
Arnold, London, 3. Auflage, 1985. 43, 208
- [281] *Einführung von Iod durch Austausch von Stickstoff und stickstoffhaltigen Gruppen*
in: E. Müller
Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 5/4, Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1960. 52
- [282] *Kinetics and mechanisms of reactions involving diazonium and diazo groups*
in: S. Patai
The chemistry of functional groups, Band „The chemistry of diazonium and diazo groups“, Wiley, Chichester, 1978. 53, 208
- [283] H. W. Grimmel, J. F. Morgan
Reaction of diazo compounds with sulfamic acid
J. Am. Chem. Soc. **70**, 1750, 1948. 55
- [284] J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, D. J. Miller
Quantitative analysis of fuel-related hydrocarbons in surface water and wastewater samples by solid-phase microextraction
Anal. Chem. **68**, 144–155, 1996. 55, 57, 176, 183
- [285] G. A. Mills, V. Walker, H. Mughal
Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids
J. Chromatogr. B **730**, 113–122, 1999. 55, 57, 175
- [286] M. R. Lee, Y. C. Yeh, W. S. Hsiang, C. C. Chen
Application of solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry for the determination of chlorophenols in urine
J. Chromatogr. B **707**, 91–97, 1998. 55, 57
- [287] C. J. Smith, C. Hansch
The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate
Food Chem. Toxicol. **38**, 637–646, 2000. 62
- [288] S. Inoue, A. Ogino, M. Kise, M. Kitano, S. Tsuchiya, T. Fujita
Partition-Coefficient of Aminouracil Derivatives
Chem. Pharm. Bull. **22**, 2064–2068, 1974. 62
- [289] M. S. Elovitz, E. J. Weber
Sediment mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and fate of the resulting aromatic (poly)amines
Environ. Sci. Technol. **33**, 2617–2625, 1999. 62

-
- [290] S. B. Haderlein, K. W. Weissmahr, R. P. Schwarzenbach
Specific adsorption of nitroaromatic: Explosives and pesticides to clay minerals
Environ. Sci. Technol. **30**, 612–622, 1996. 62
- [291] R. Mahmud, M. D. Tingle, J. L. Maggs, M. T. D. Cronin, J. C. Dearden, B. K. Park
Structural basis for the haemotoxicity of dapsone: The importance of the sulphonyl group
Toxicology **117**, 1–11, 1997. 62
- [292] C. D. Wu, D. B. Wei, X. H. Liu, L. S. Wang
Estimation of the sorption of substituted aromatic compounds on the sediment of the Yangtse River
Bull. Environ. Contam. Toxicol. **66**, 777–783, 2001. 62
- [293] W. de Wolf, J. H. M. de Bruijn, W. Seinen, J. L. M. Hermens
Influence of Biotransformation on the Relationship between Bioconcentration Factors and Octanol Water Partition-Coefficients
Environ. Sci. Technol. **26**, 1197–1201, 1992. 62
- [294] C. V. Eadsforth, P. Moser
Assessment of Reverse-Phase Chromatographic Methods for Determining Partition-Coefficients
Chemosphere **12**, 1459–1475, 1983. 62
- [295] C. T. Chiou, V. H. Freed, D. W. Schmedding, R. L. Kohnert
Partition-Coefficient and Bioaccumulation of Selected Organic Chemicals
Environ. Sci. Technol. **11**, 475–478, 1977. 62
- [296] S. Bulusu, T. Axenrod
Electron impact fragmentation mechanisms of 2,4,6-trinitrotoluene derived from metastable transitions and isotopic labeling
Organic Mass Spectrom. **14**, 585–592, 1979. 63
- [297] S. A. McLuckey, G. L. Glish
The effect of charge on hydroxyl loss from ortho-substituted nitrobenzene ions
Organic Mass Spectrom. **22**, 224–228, 1987. 63
- [298] J. Yinon
Mass spectral fragmentation pathways in 2,4,6-trinitroaromatic compounds
Organic Mass Spectrom. **22**, 501–505, 1987. 63
- [299] C. D. S. Tomlin (Ed.)
The pesticide manual
British Crop Protection Council, Farnham, 10. Auflage, 1995. 67
- [300] *Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln*
Industrieverband Agrar e.V., München, 2, 1990. 67
- [301] K. Doerffel
Statistik in der analytischen Chemie
Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 5, 1990. 74
- [302] L. Nardi
Determination of siloxane-water partition coefficients by capillary extraction-high-resolution gas chromatography - Study of aromatic solvents
J. Chromatogr. A **985**, 39–45, 2003. 75

- [303] H. J. Hübschmann
Handbuch der GC/MS: Grundlagen und Anwendung
VCH, Weinheim, 1996. 80
- [304] S. Slaets, F. Laturus, F. C. Adams
Microwave induced plasma atomic emission spectrometry. A suitable detection system for the determination of volatile halocarbons
Fresenius J. Anal. Chem. **364**, 133–140, 1999. 92, 93, 143
- [305] J. T. Andersson, B. Schmid
The atomic emission detector in gas chromatographic trace analysis. Some studies on the performance and applications
Fresenius J. Anal. Chem. **346**, 403–409, 1993. 92
- [306] S. Pedersen-Bjergaard, T. Greibrokk
Effect of make-up gas in on-column atomic emission spectrometric detection for capillary gas chromatography
J. Anal. At. Spectrom. **11**, 117–121, 1996. 92
- [307] H. J. Stan, M. Linkerhägner
Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection. State-of-the-art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting
J. Chromatogr. A **750**, 369–390, 1996. 92, 216
- [308] W. R. McLean, D. L. Stanton, G. E. Penketh
Quantative tunable element-selective detector for gas chromatography
Analyst **98**, 432–442, 1973. 93
- [309] J. P. J. van Dalen, P. A. de Lezenne Coulander, L. de Galan
Optimization of the microwave-induced plasma as an element-selective detector for non-metals
Anal. Chim. Acta **94**, 1–19, 1977. 93
- [310] B. D. Quimby, J. J. Sullivan
Evaluation of a microwave cavity, discharge tube, and gas flow system for combined gas chromatography-atomic emission detection
Anal. Chem. **62**, 1027–1034, 1990. 93
- [311] K. J. Slatkavitz, P. C. Uden, L. D. Hoey, R. M. Barnes
Atmospheric-pressure microwave-induced helium plasma spectroscopy for simultaneous multielement gas chromatographic detection
J. Chromatogr. **302**, 277–287, 1984. 93, 95
- [312] C. Böhme, T. C. Schmidt, E. von Löw, G. Stork
Solid-phase extraction of aminobenzoic acids and aminotoluenesulfonic acids with graphitized carbon black
Fresenius J. Anal. Chem. **360**, 805–807, 1998. 98
- [313] B. Schäfer, P. Hennig, W. Engewald
Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid phase microextraction
J. High Resol. Chromatogr. **18**, 587–592, 1995. 105, 224

-
- [314] B. Schäfer, P. Hennig, W. Engewald
Methodological aspects of headspace SPME: Application of the retention index system
J. High Resol. Chromatogr. **20**, 217–221, 1997. 105
- [315] E. Kovats
Gas chromatographic characterization of organic compounds. I. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes, and ketones
Helv. Chim. Acta **41**, 1915–32, 1958. 105
- [316] M. Sakamoto, T. Tsutsumi
Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in water
J. Chromatogr. A **1028**, 63–74, 2004. 118
- [317] P. Lind, G. Skarping, M. Dalene
Biomarkers of toluene diisocyanate and thermal degradation products of polyurethane, with special reference to the sample preparation
Anal. Chim. Acta **333**, 277–283, 1996. 131, 220
- [318] T. C. Schmidt
Aromatische Amine in Wasser
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 1997. 139, 207
- [319] D. D. Perrin
Dissociation constants of organic bases in aqueous solution
Butterworth, London, 1972. 139
- [320] A. Putschew, M. Jekel
Iodierte Röntgenkontrastmittel im anthropogen beeinflussten Wasserkreislauf
Vom Wasser **97**, 103–113, 2001. 142
- [321] A. Putschew, M. Jekel
Induced in-source fragmentation for the selective detection of organic bound iodine by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry
Rapid Commun. Mass Spectrom. **17**, 2279–2282, 2003. 142
- [322] J. S. Edmonds, M. Morita
The determination of iodine species in environmental and biological samples (Technical report)
Pure Appl. Chem. **70**, 1567–1584, 1998. 143
- [323] B. D. Quimby, P. A. Larson, P. C. Dryden
A comparison of the HP G2350A AED vs. HP 5921A AED for average values of MDL and selectivity for selected elements
HP Application Note 228–363, 1996. 143
- [324] NIST98 - NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library
Gaithersburg, Version 1,6, 1998. 155
- [325] M. Leß
Bestimmung aromatischer Amine in Wasser durch Festphasenextraktion und nachfolgende Derivatisierung durch Iodierung
Diplomarbeit, Universität Marburg, Fachbereich Chemie, 1997. 165, 169

- [326] T. Bonarius
mündliche Mitteilung
2001. 165
- [327] R. Ferrari, T. Nilsson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. del Carlo, P. Dellavedova, E. Fattore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, S. Morgillo, L. Müller, M. Volante
Inter-laboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/l level in water samples
J. Chromatogr. A **795**, 371–376, 1998. 176
- [328] P. A. Frazey, R. M. Barkley, R. E. Sievers
Solid-phase microextraction with temperature-programmed desorption for the analysis of iodination disinfection byproducts
Anal. Chem. **70**, 638–644, 1998. 177, 194
- [329] B. Cancho, F. Ventura, M. T. Galceran
Solid-phase microextraction for the determination of iodinated trihalomethanes in drinking water
J. Chromatogr. A **841**, 197–206, 1999. 177
- [330] F. Effenberger, M. Koch, W. Streicher
Nucleophile Substitution von Nitrit in Nitrobenzolen, Nitrobiphenylen und Nitronaphthalinen
Chem. Ber. **124**, 163–173, 1991. 192
- [331] P. Martin
Synthese von natürlichen Haloindolen via Hetero-Cope-Umlagerung von Vinyl-N-phenylhydroxamaten
Helv. Chim. Acta **71**, 344–347, 1988. 192
- [332] 196
Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV)
BGBl.I, vom 21.05.2001.
- [333] S. Kromidas
Validierung in der Analytik
Wiley-VCH, Weinheim, 1999. 197
- [334] M. W. Duncan, A. Poljak
Amino acid analysis of peptides and proteins on the femtomole scale by gas chromatography mass spectrometry
Anal. Chem. **70**, 890–896, 1998. 207
- [335] V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, S. Angelino, M. Vincenti
Ultratrace determination of highly hydrophilic compounds by 2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoropentyl chloroformate-mediated derivatization directly in water
J. Am. Soc. Mass Spectrom. **10**, 1328–1336, 1999. 207
- [336] N. Itoh, H. Tao, T. Ibusuki
Optimization of aqueous acetylation for determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry
Anal. Chim. Acta **535**, 243–250, 2005. 207, 208

-
- [337] S. Insa, V. Salvado, E. Antico
Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples
J. Chromatogr. A **1047**, 15–20, 2004. 207, 208
- [338] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, Y. Yoshimura, H. Nakazawa
Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. A **1041**, 19–26, 2004. 207, 208
- [339] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela
Optimization of a derivatization-solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples
J. Chromatogr. A **963**, 137–148, 2002. 207, 208
- [340] L. Pan, J. Pawliszyn Derivatization/solid-phase microextraction: New approach to polar analytes
Anal. Chem. **69**(2), 196–205, 1997. 208
- [341] G. Wittmann, H. Van Langenhove, J. Dewulf
Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography
J. Chromatogr. A **874**, 225–234, 2000. 208
- [342] T. Henriksen, B. Svensmark, B. Lindhardt, R. K. Juhler
Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC-MS
Chemosphere **44**, 1531–1539, 2001. 208
- [343] H. G. Uglund, M. Krogh, K. E. Rasmussen
Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography
J. Chromatogr. B **701**, 29–38, 1997. 208
- [344] T. Nilsson, D. Baglio, I. Galdo-Miguez, J. Ø. Madsen, S. Facchetti
Derivatization/solid-phase microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry for the analysis of phenoxy acid herbicides in aqueous samples
J. Chromatogr. A **826**, 211–216, 1998. 208
- [345] E. H. M. Koster, C. H. P. Bruins, C. Wemes, G. J. de Jong
On-fiber derivatization for direct immersion solid-phase microextraction Part I: Acylation of amphetamine with pentafluorobenzoyl chloride
J. Sep. Sci. **24**, 116–122, 2001. 208
- [346] M. N. Sarrión, F. J. Santos, M. T. Galceran
In situ derivatization/solid phase microextraction for the determination of haloacetic acids in water
Anal. Chem. **72**, 4865–4873, 2000. 208
- [347] A. Díaz, F. Ventura, M. T. Galceran
Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method
Anal. Chem. **74**, 3869–3876, 2002. 208

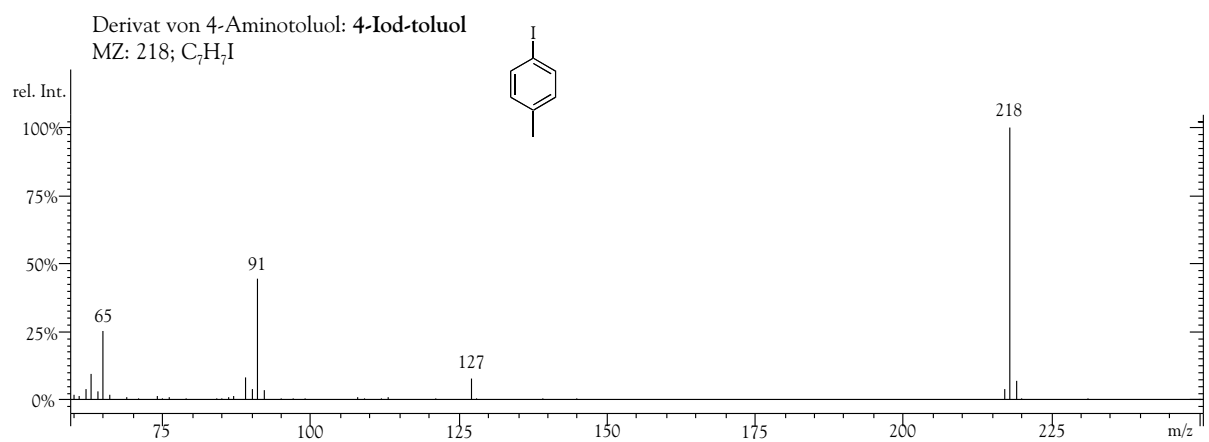
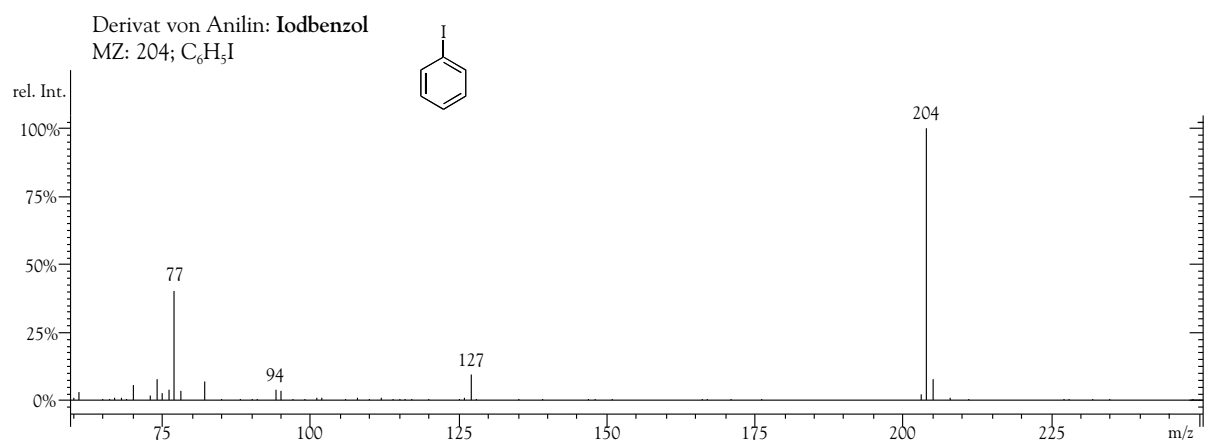
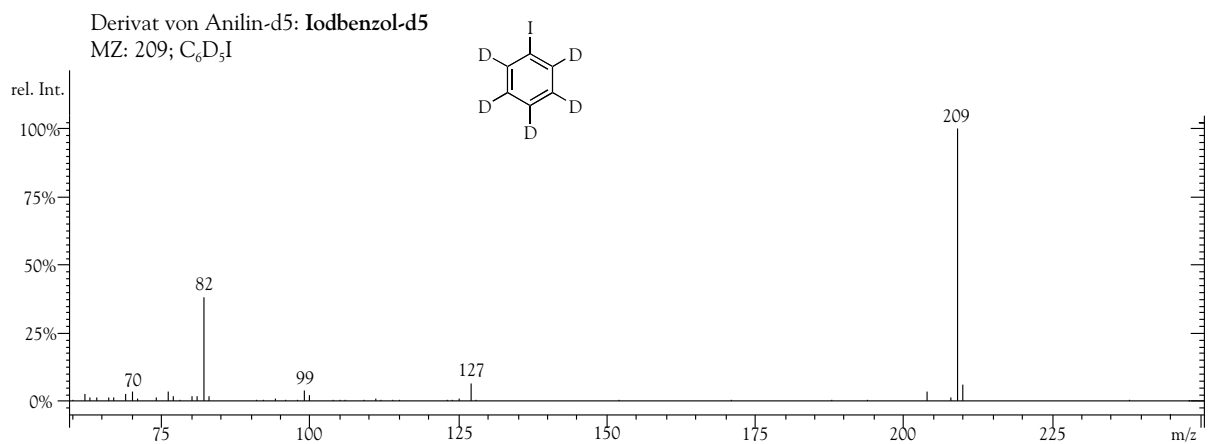
- [348] M. Abdel-Rehim, Z. Hassan, L. Blomberg, M. Hassan
On-line derivatization utilizing solid-phase microextraction (SPME) for determination of busulphan in plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)
Ther. Drug Monit. **25**, 400–406, 2003. [210](#)
- [349] S. Ulrich, J. Martens
Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma
J. Chromatogr. B **696**, 217–234, 1997. [210](#)
- [350] K. F. Poon, P. K. S. Lam, M. H. W. Lam
Determination of polychlorinated biphenyls in human blood serum by SPME
Chemosphere **39**, 905–912, 1999. [210](#)
- [351] W. M. Mullett, J. Pawliszyn
Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction
Anal. Chem. **74**, 1081–1087, 2002. [210](#)
- [352] F. Hernandez, J. Beltran, F. J. Lopez, J. V. Gaspar
Use of solid phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples
Anal. Chem. **72**, 2313–2322, 2000. [213](#)
- [353] G. Gmeiner, C. Krassnig, E. Schmid, H. Tausch
Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation - solid-phase microextraction
J. Chromatogr. B **705**, 132–138, 1998. [216](#)
- [354] G. Gmeiner, P. Gärtner, C. Krassnig, H. Tausch
Identification of various urinary metabolites of fluorene using derivatization solid-phase microextraction
J. Chromatogr. B **766**, 209–218, 2002. [216](#)
- [355] R. Reuther, L. Jaeger, B. Allard
Determination of organometallic forms of mercury, tin and lead by in situ derivatization, trapping and gas chromatography - atomic emission detection
Anal. Chim. Acta **394**, 259–269, 1999. [216](#)
- [356] R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch
Element-selective detection of pesticides by gas-chromatography atomic-emission detection and solid-phase microextraction
J. Chromatogr. A **683**, 175–183, 1994. [216](#)
- [357] N. A. Stevens, M. F. Borgerding
GC-AED studies of nicotine fate in a burning cigarette
Anal. Chem. **71**, 2179–2185, 1999. [217](#), [218](#), [219](#)
- [358] N. R. Hardas, R. Adam, P. C. Uden
Alkene determination by bromination and gas chromatography with element-selective atomic plasma spectroscopic detection
J. Chromatogr. A **844**, 249–258, 1999. [217](#)

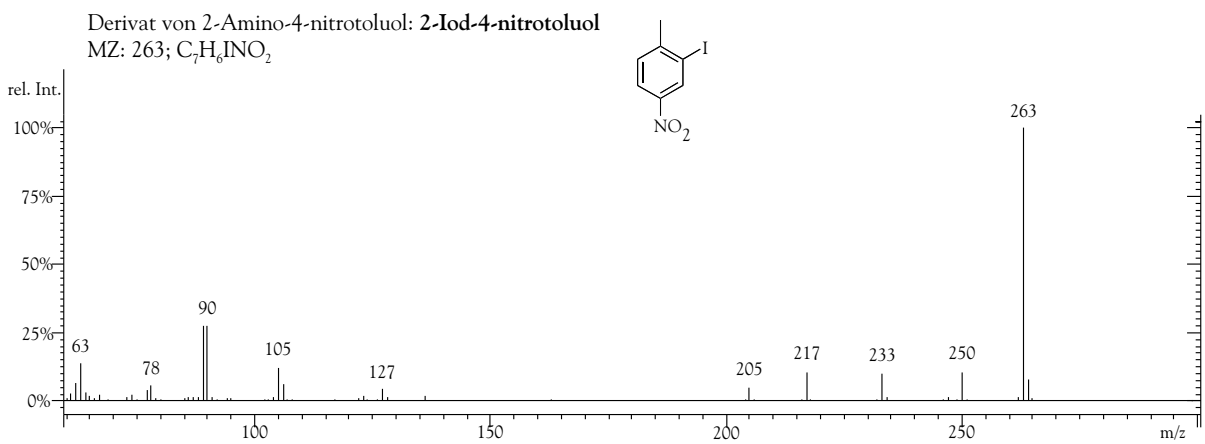
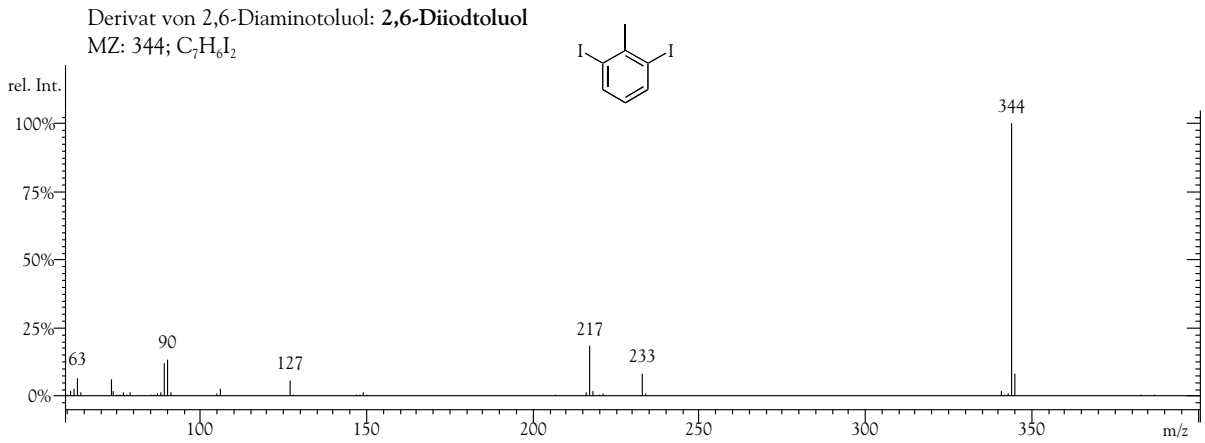
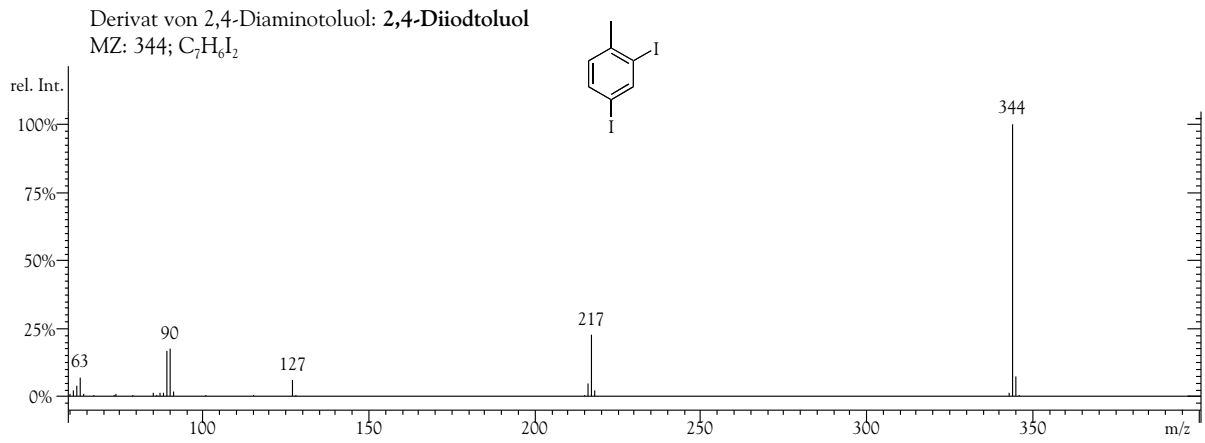
-
- [359] J. Rolfes, J. T. Andersson
Determination of alkylphenols after derivatization to ferrocenecarboxylic acid esters with gas chromatography-atomic emission detection
Anal. Chem. **73**, 3073–3082, 2001. 217
- [360] C. Asmussen, H. J. Stan
Determination of non-ionic surfactants of the alcohol polyethoxylate type by means of high temperature gas chromatography and atomic emission detection
J. High Resolut. Chromatogr. **21**, 597–604, 1998. 217
- [361] I. D. Wilson, U. A. T. Brinkman
Hyphenation and hypernation - The practice and prospects of multiple hyphenation
J. Chromatogr. A **1000**, 325–356, 2003. 218
- [362] M. Schweigkofler, R. Niessner
Determination of siloxanes and VOC in landfill gas and sewage gas by canister sampling and GC-MS/AES analysis
Environ. Sci. Technol. **33**, 3680–3685, 1999. 218, 219
- [363] L. L. P. van Stee, P. E. G. Leonards, R. J. J. Vreuls, U. A. T. Brinkman
Identification of non-target compounds using gas chromatography with simultaneous atomic emission and mass spectrometric detection (GC-AED/MS): analysis of municipal wastewater
Analyst **124**, 1547–1552, 1999. 218, 219
- [364] H. G. J. Mol, T. Hankemeier, U. A. T. Brinkman
Gas chromatography of organic microcontaminants using atomic-emission and mass spectrometric detection combined in one instrument (GC-AED/MS)
LC-GC Int. **12**, 108–120, 1999. 218, 219
- [365] Y. Briker, Z. Ring, A. Iacchelli, N. McLean
Miniaturized method for separation and quantification of nitrogen species in petroleum distillates
Fuel **82**, 1621–1631, 2003. 218, 219
- [366] T. Hankemeier, J. Rozenbrand, M. Abhadur, J. J. Vreuls, U. A. T. Brinkman
Data correlation in on-line solid-phase extraction gas chromatography atomic emission mass spectrometric detection of unknown microcontaminants
Chromatographia **48**, 273–283, 1998. 218, 219
- [367] M. Mazurek, Z. Witkiewicz, S. Popiel, M. Śliwakowski
Capillary gas chromatography-atomic emission spectroscopy-mass spectrometry analysis of sulphur mustard and transformation products in a block recovered from the Baltic Sea
J. Chromatogr. A **919**, 133–145, 2001. 218, 219
- [368] Y. Kotseridis, R. Baumes
Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine
J. Agric. Food Chem. **48**, 400–406, 2000. 218, 219
- [369] U. Thuß, P. Popp, C. Ehrlich, W. D. Kalkoff
Identification and quantification of thiaarenes in the flue gas of lignite-fired domestic heating
J. High Resolut. Chromatogr. **23**, 457–473, 2000. 218, 219

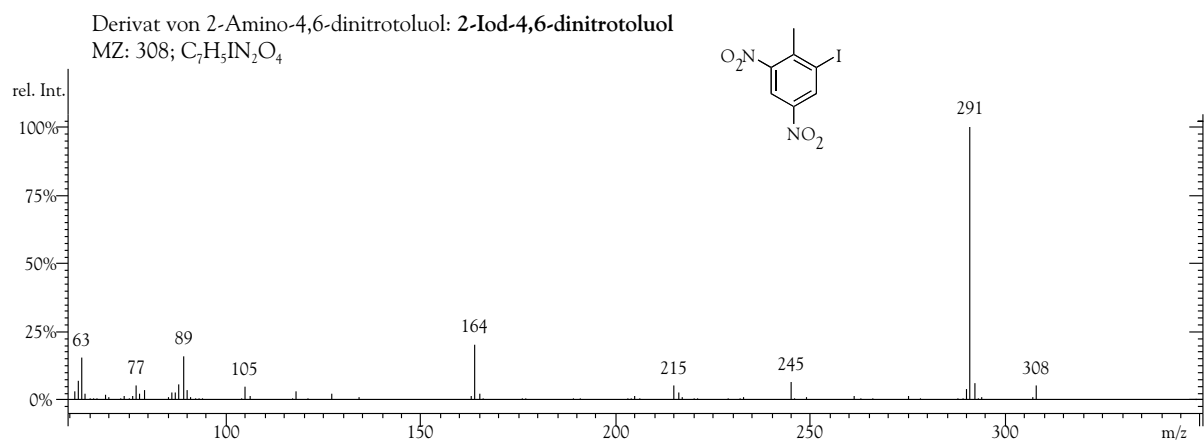
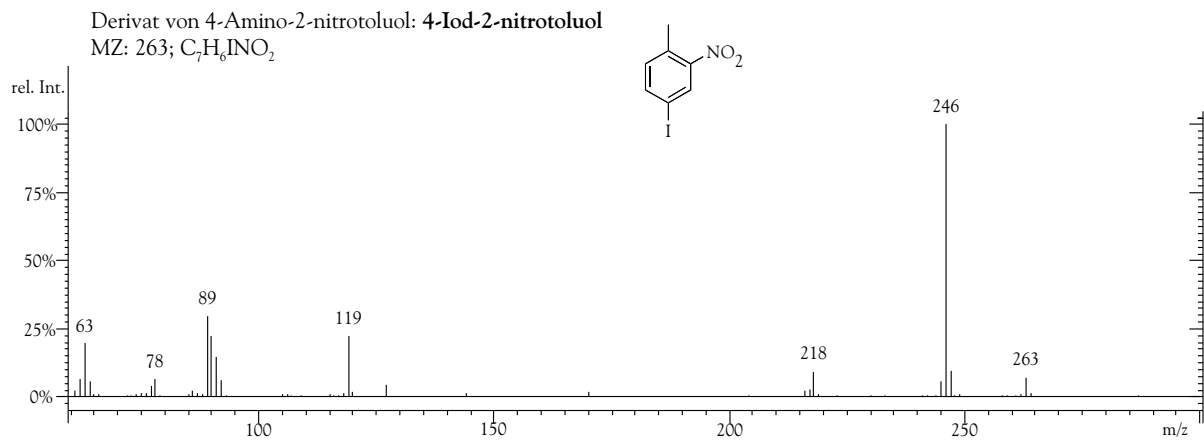
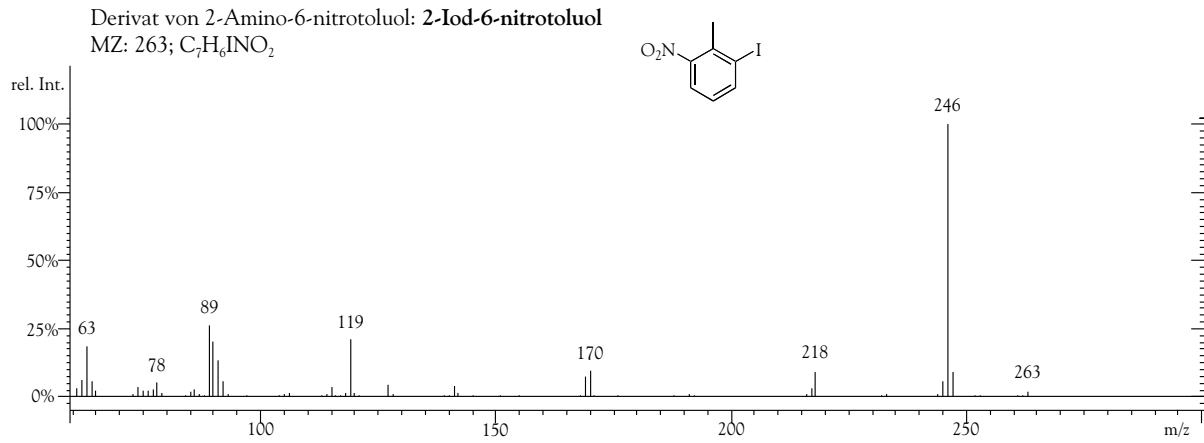
- [370] R. M. Z. Reckendorf
Identification of phenyl-substituted polycyclic aromatic compounds in ring furnace gases using GC-MS and GC-AED
Chromatographia **45**, 173–182, 1997. 218, 219
- [371] U. Fuchslueger, H. J. Grether, M. Grasserbauer
Hyphenation of Curie-point-pyrolysis high-resolution gas-chromatography with several spectroscopic methods for the analysis of cured epoxy-resins
Fresenius J. Anal. Chem. **349**, 283–288, 1994. 218, 219
- [372] F. C. Y. Wang
Determination of polyacrylamide in polyvinyl alcohol by pyrolysis gas chromatography with atomic emission detection
J. Chromatogr. A **753**, 101–108, 1996. 218, 219
- [373] K. Laniewski, T. Wännman, G. Hagman
Gas chromatography with mass spectrometric, atomic emission and Fourier transform infrared spectroscopic detection as complementary analytical techniques for the identification of unknown impurities in pharmaceutical analysis
J. Chromatogr. A **985**, 275–282, 2003. 218
- [374] K. Laniewski, M. Vågerö, E. Forsberg, T. Forngren, G. Hagman
Complementary use of gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-atomic emission detection and nuclear magnetic resonance for identification of pharmaceutically related impurities of unknown structures
J. Chromatogr. A **1027**, 93–102, 2004. 218
- [375] S. Nakamura, M. Takino, S. Daishima
Analysis of pressure sensitive adhesives by GC/MS and GC/AED with temperature programmable pyrolyzer
Anal. Sci. **16**, 627–631, 2000. 218
- [376] S. Pedersen-Bjergaard, S. I. Semb, J. Vedde, E. M. Brevik, T. Greibrokk
Environmental screening by capillary gas chromatography combined with mass spectrometry and atomic emission spectroscopy
Chemosphere **32**, 1103–1115, 1996. 218
- [377] K. Laniewski, H. Bören, A. Grimvall
Identification of volatile and extractable chloroorganics in rain and snow
Environ. Sci. Technol. **32**, 3935–3940, 1998. 218
- [378] H. Frischenschlager, C. Mittermayr, M. Peck, E. Rosenberg, M. Grasserbauer
The potential of gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission detection (GC-MIP-AED) as a complementary analytical technique in environmental screening analysis of aqueous samples
Fresenius J. Anal. Chem. **359**, 213–221, 1997. 218
- [379] C. A. Clemons, A. P. Altshuller
Responses of electron-capture detector to halogenated substances
Anal. Chem. **38**, 133–136, 1966. 224
- [380] M. E. Sitzmann
Synthesis of 2,6-diamino-4-nitrotoluene
J. Chem. Eng. Data **21**, 242–243, 1976. 231, 232

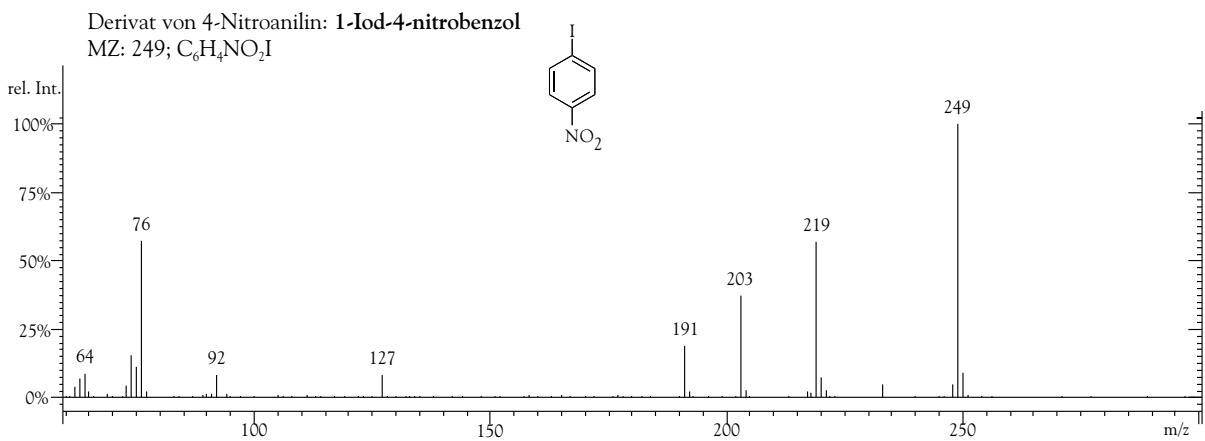
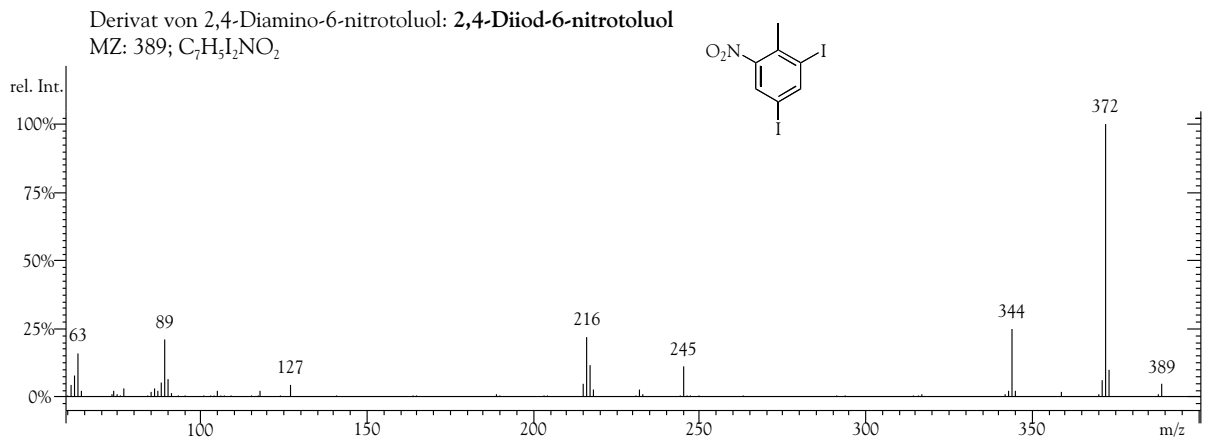
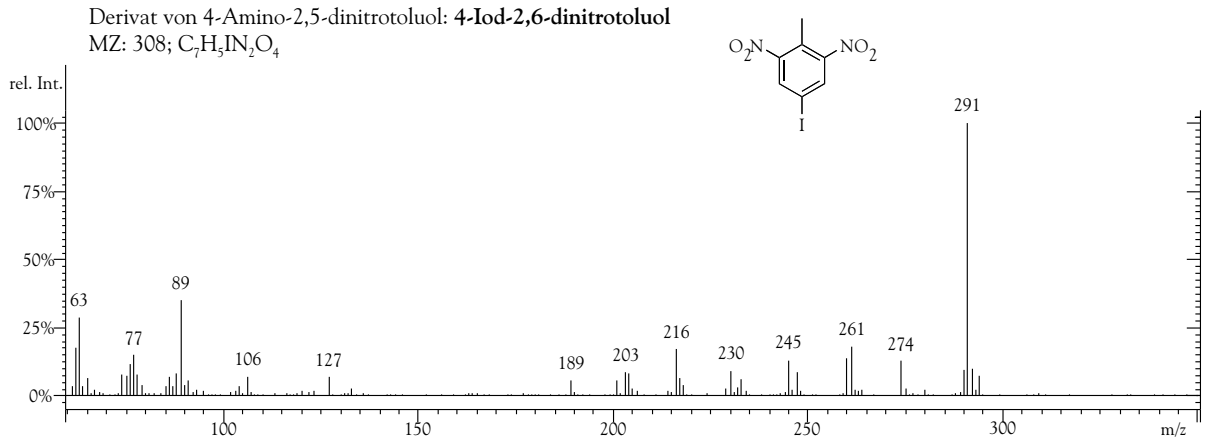
12 Anhang

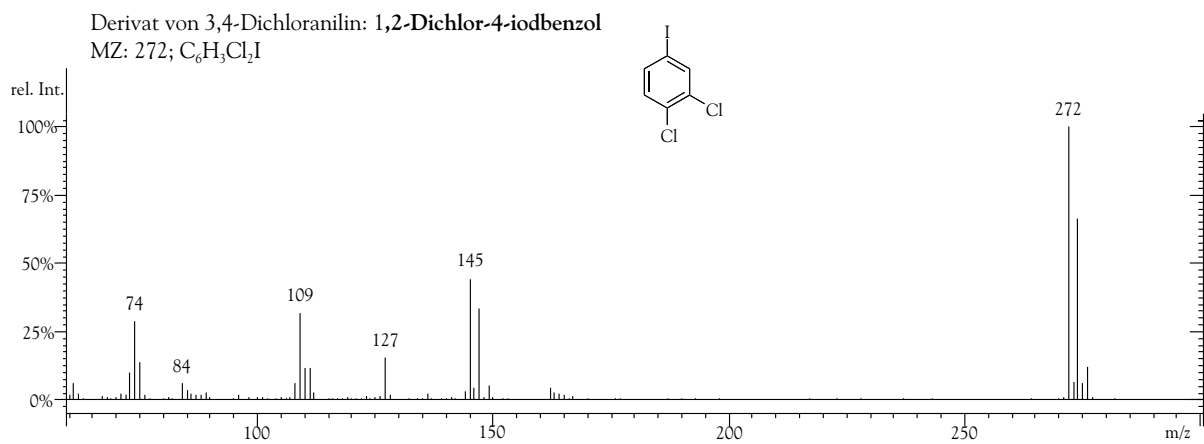
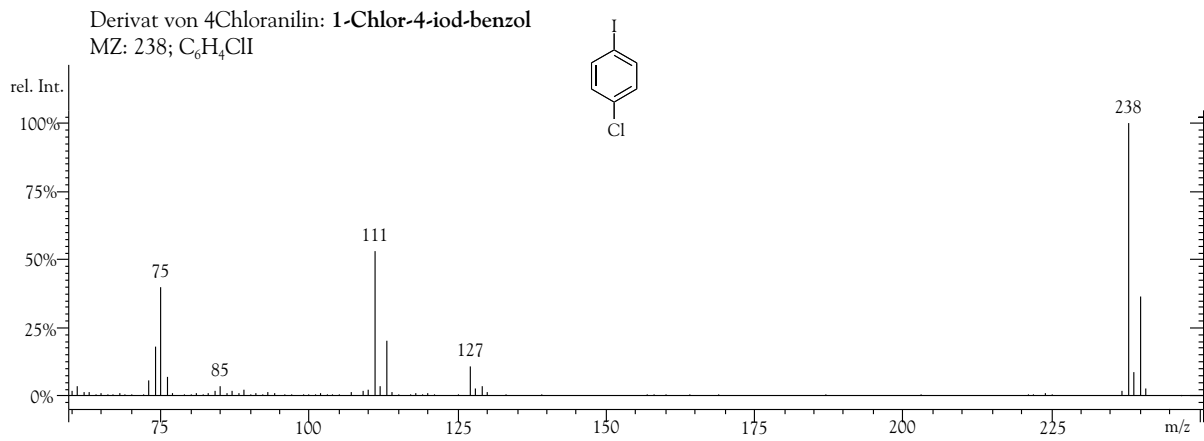
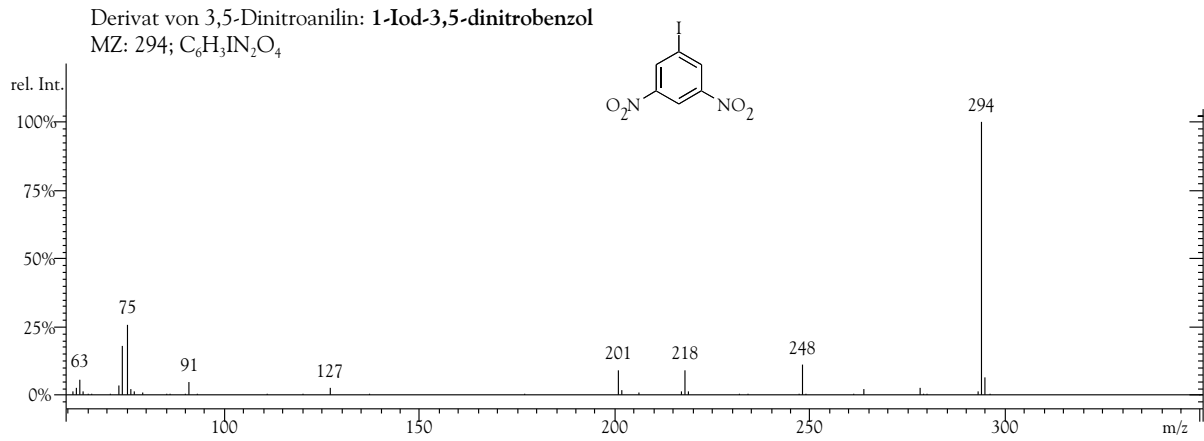
12.1 Massenspektren der Derivate



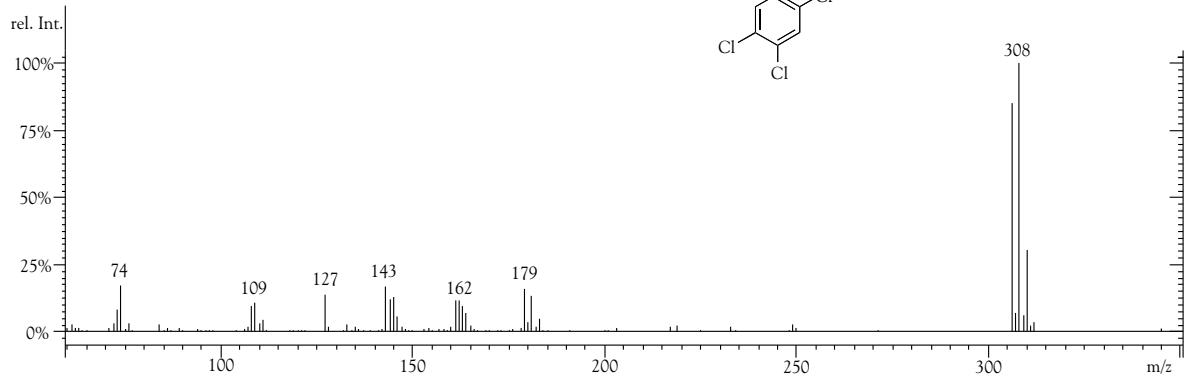




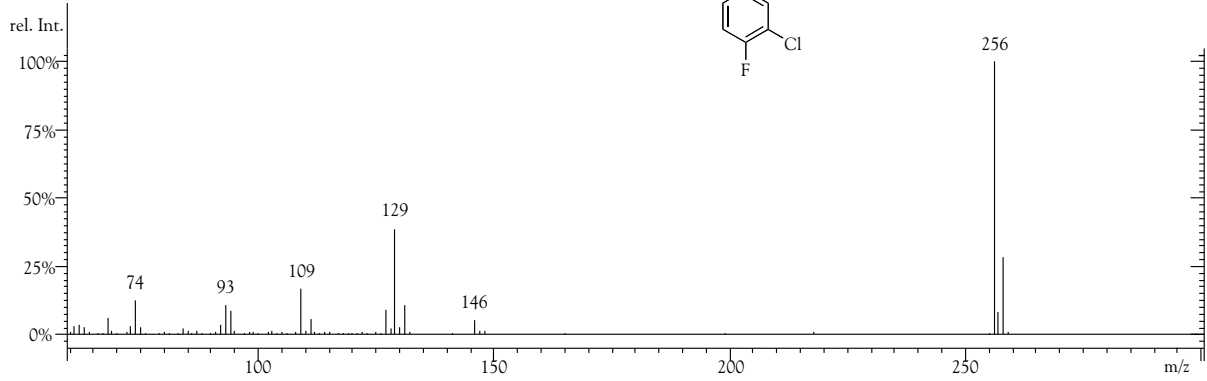




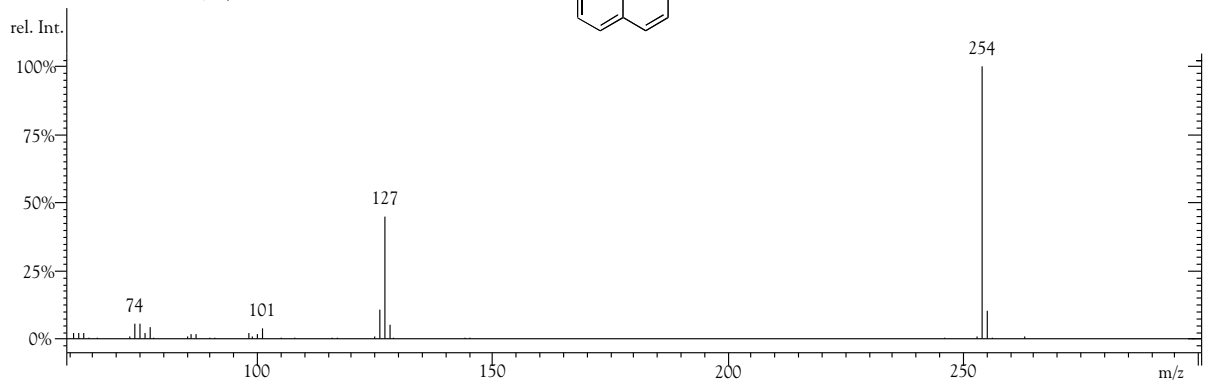
Derivat von 2,4,5-Trichloranilin: **1,3,4-Trichlor-6-iod-benzol**
 MZ: 306; C₆H₂Cl₃I

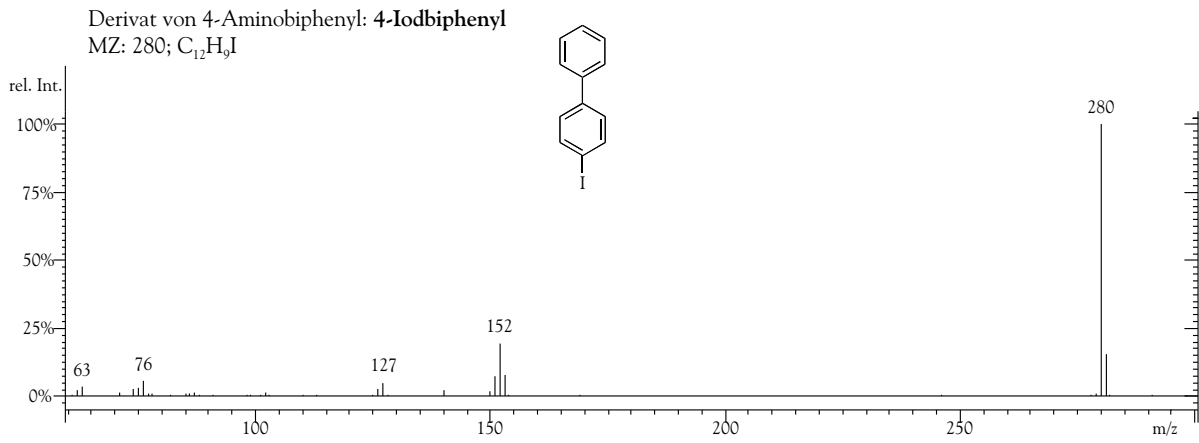
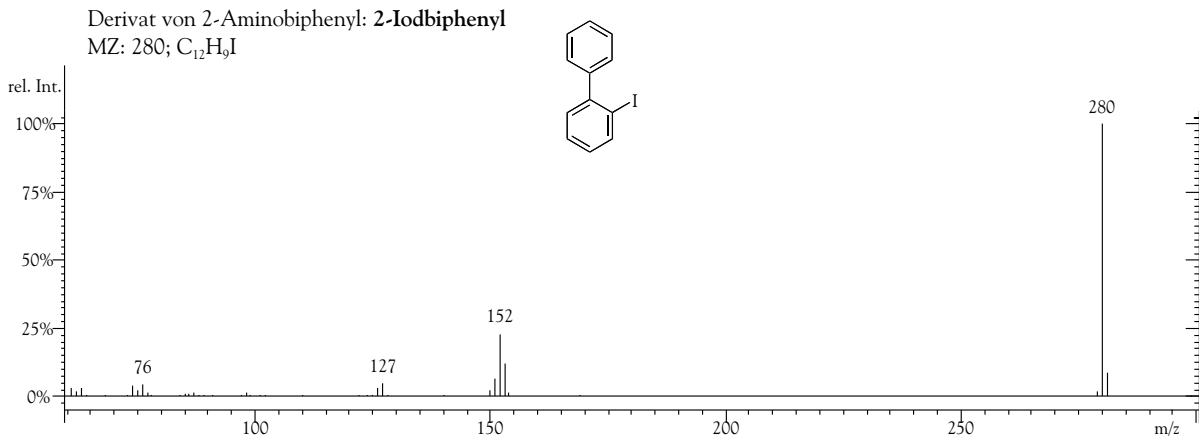


Derivat von 3-Chlor-4-fluoranilin: **1-Chlor-2-fluor-4-iodbenzol**
 MZ: 256; C₆H₃ClFI

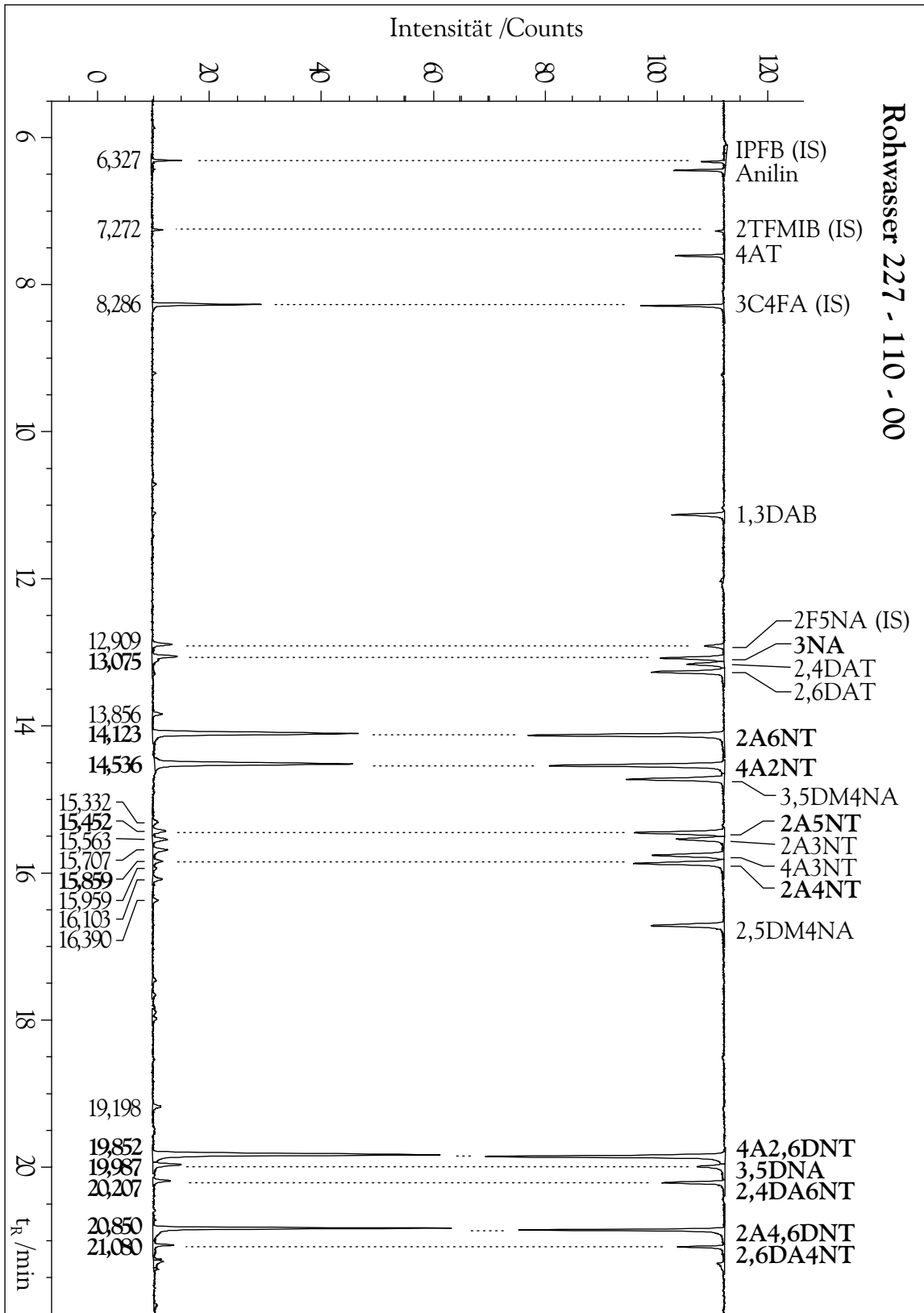


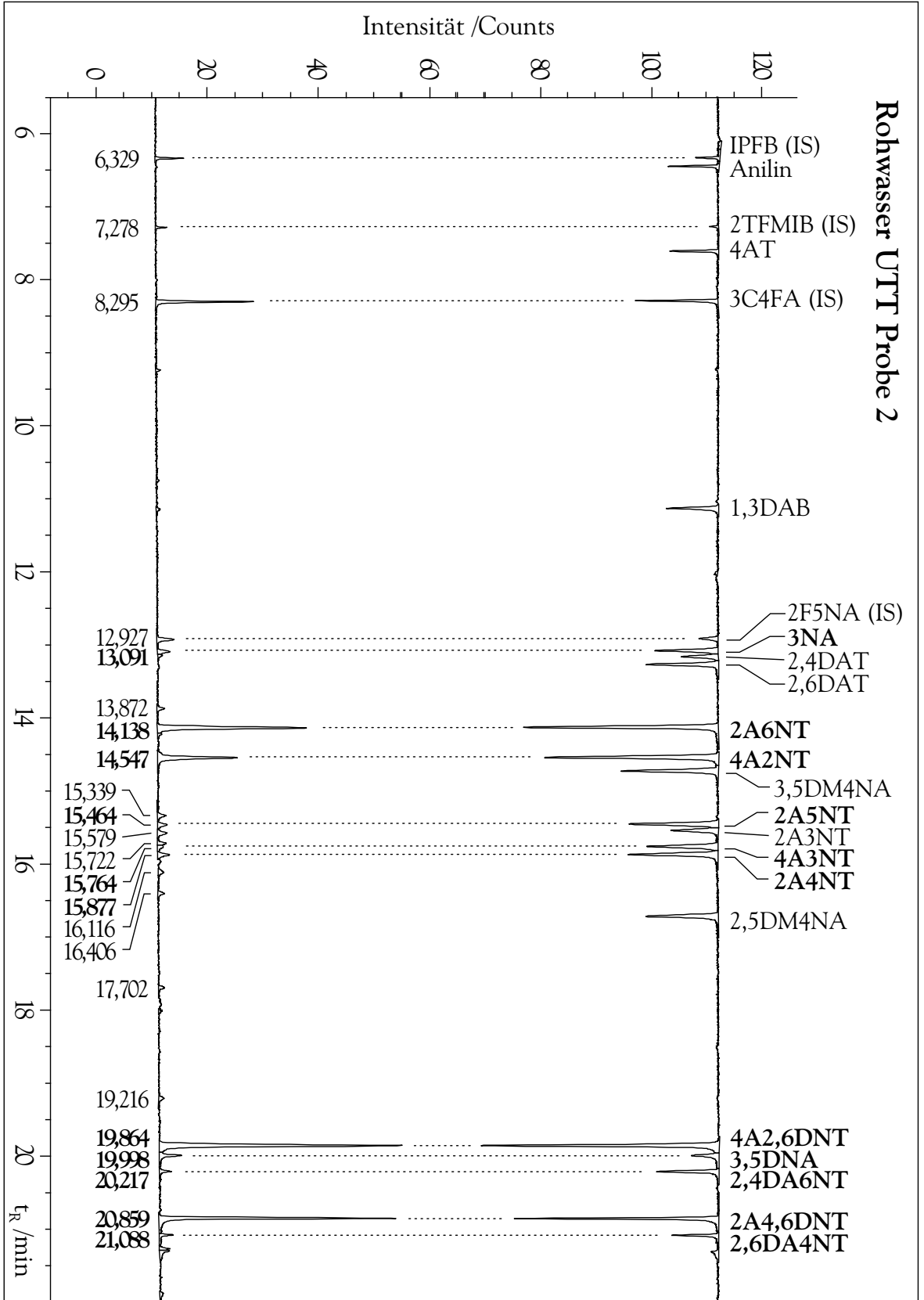
Derivat von 2-Naphthylamin: **2-Iodnaphthalin**
 MZ: 254; C₁₀H₇I

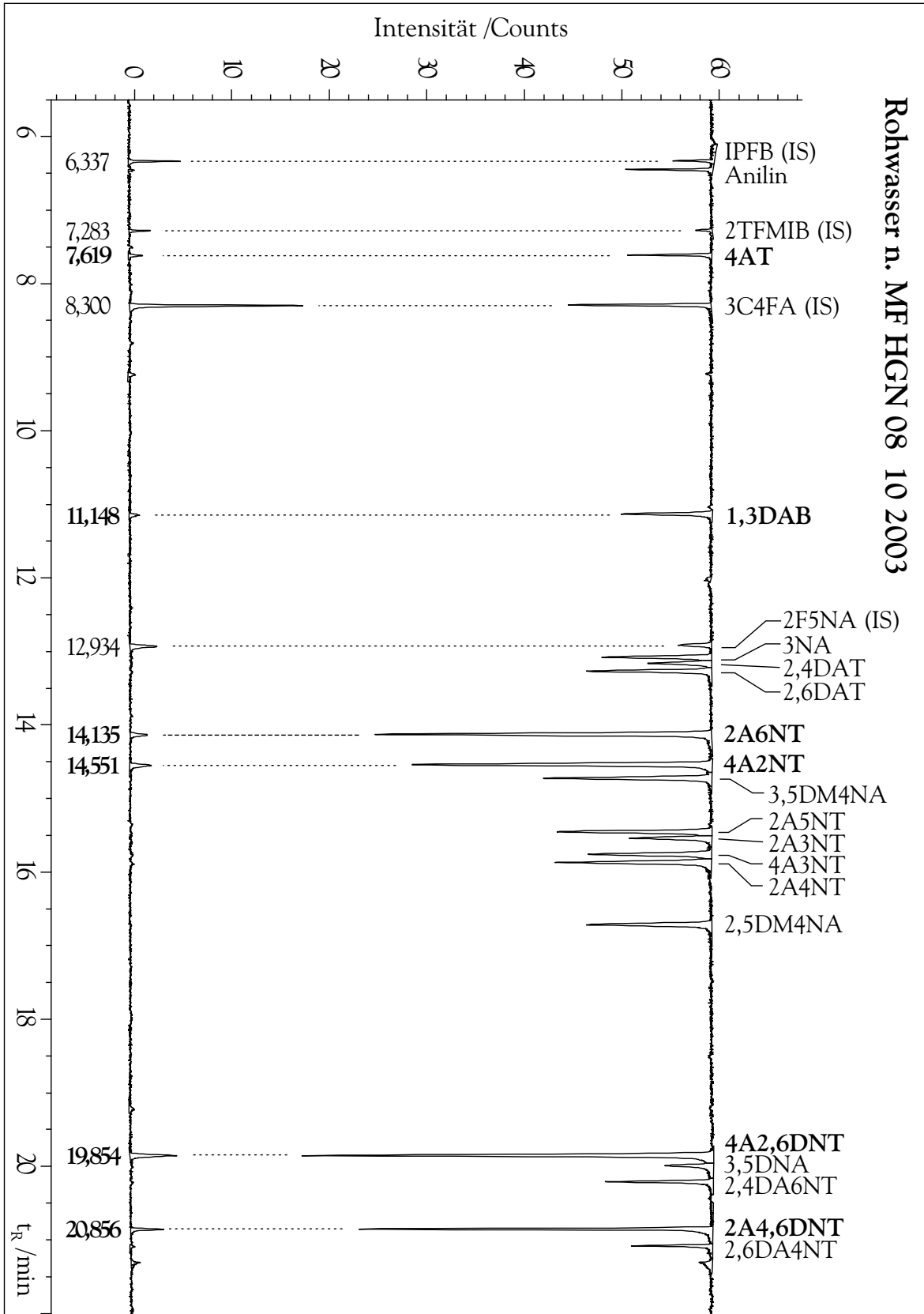


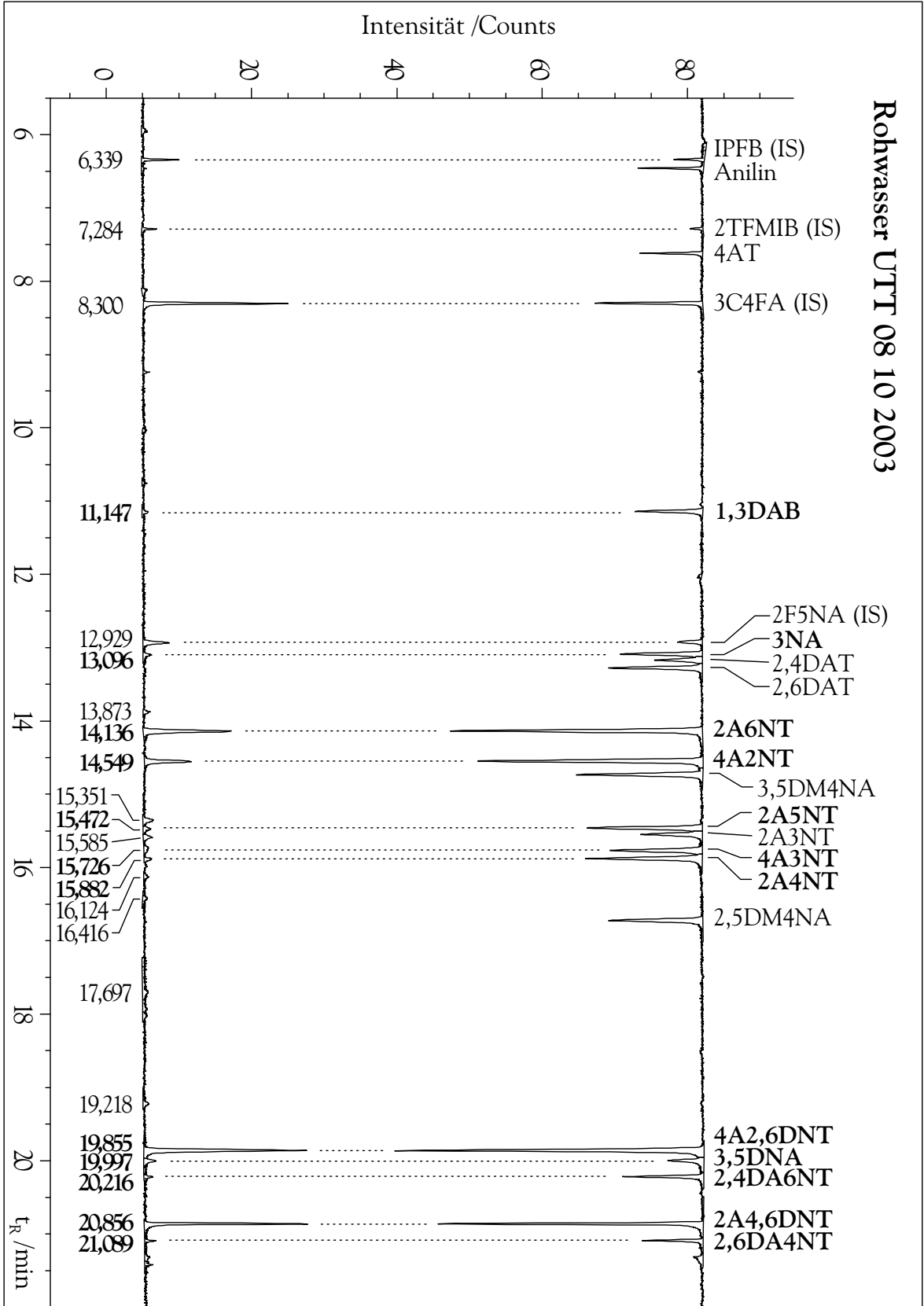


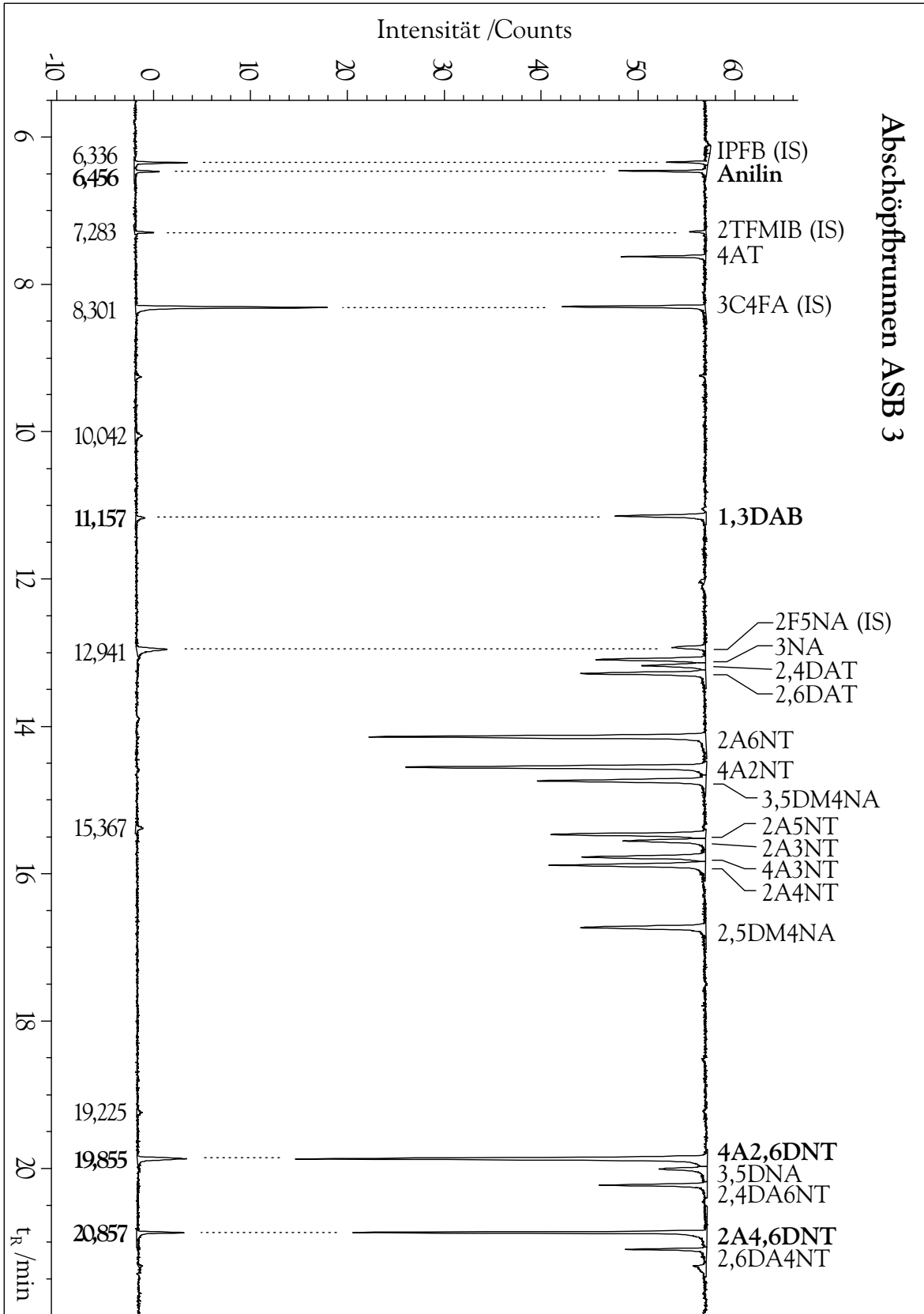
12.2 Chromatogramme von Wasserproben der Rüstungsalzlasten

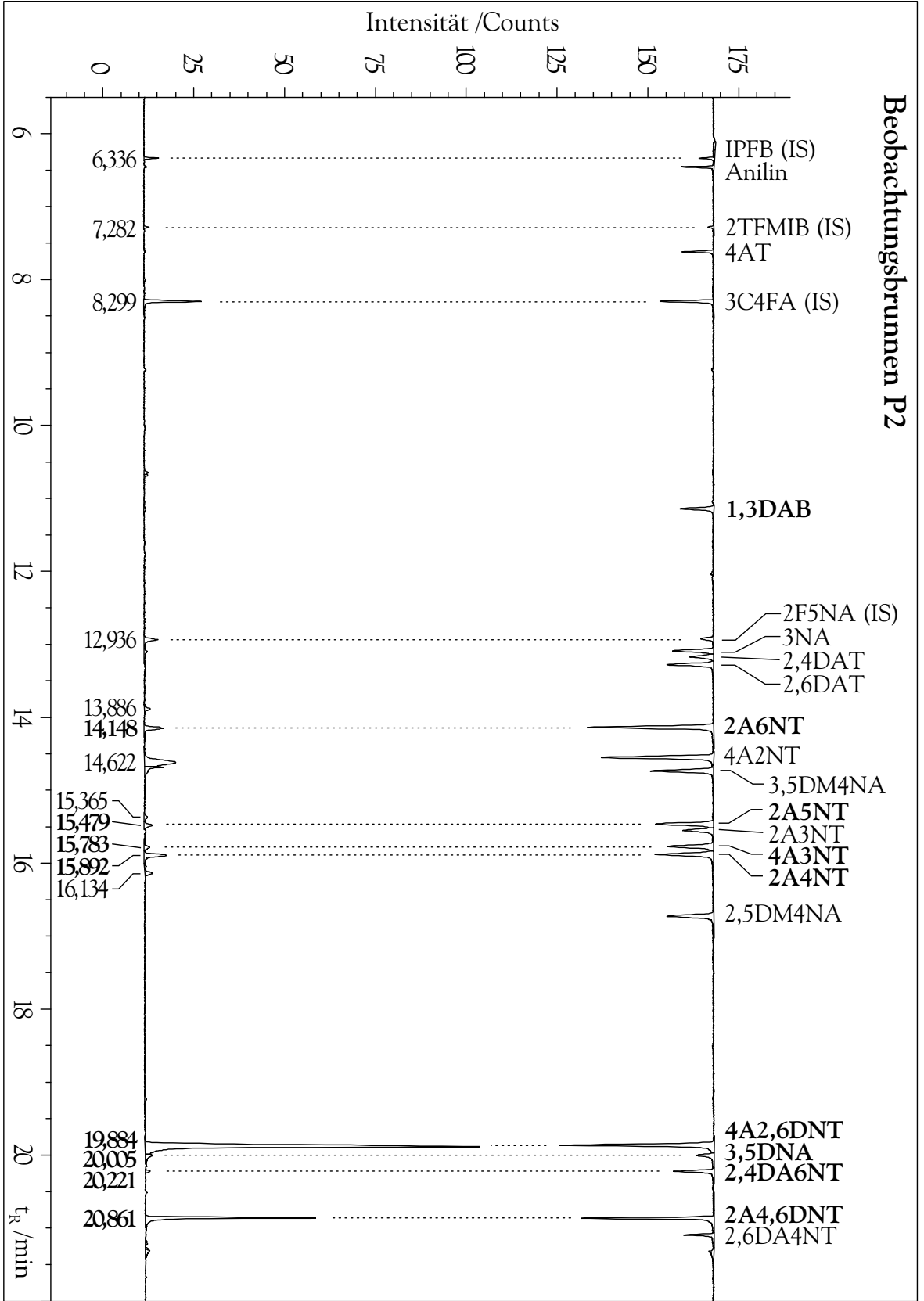






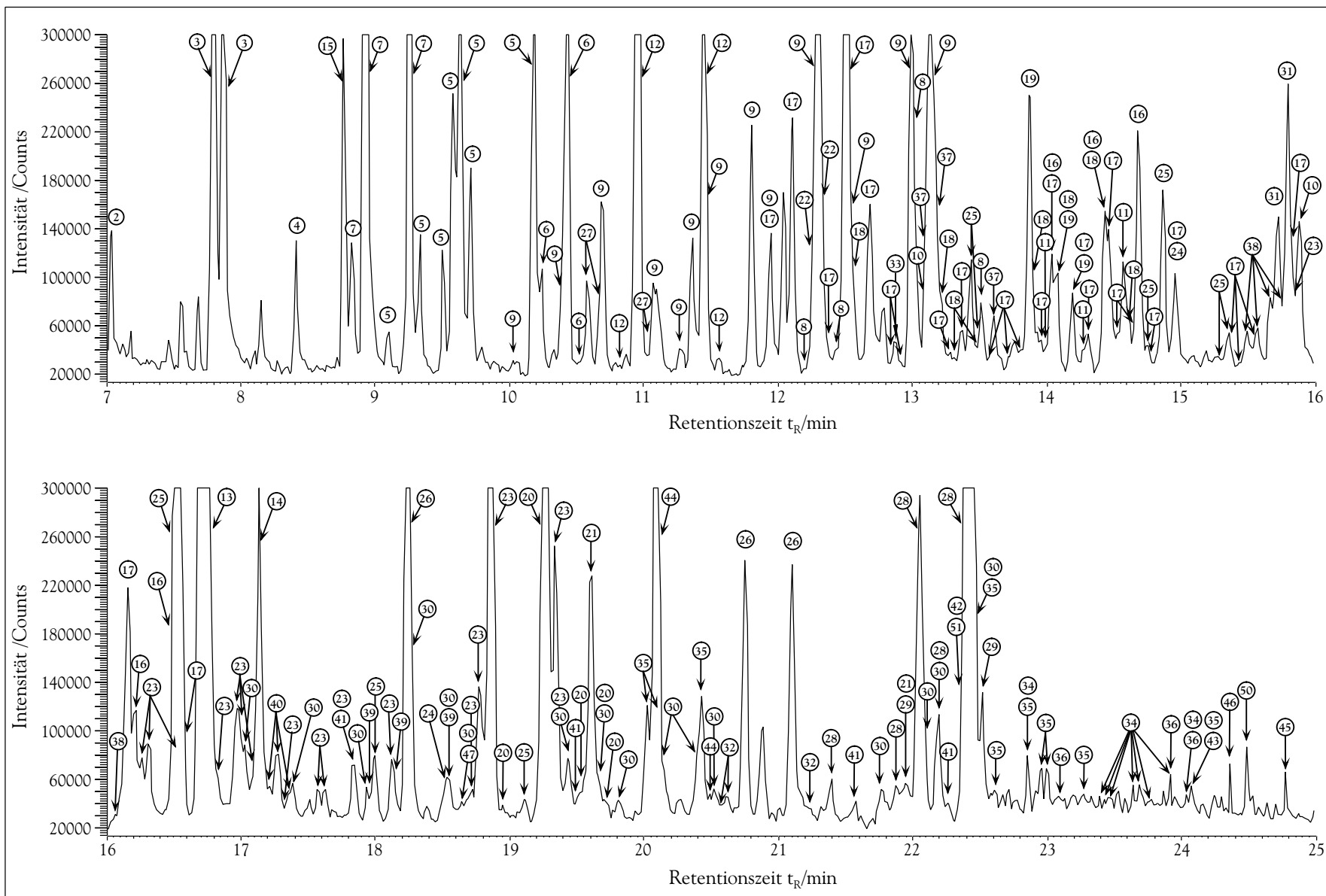






12.3 Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers

Abbildung 61 (*gegenüberliegende Seite*): Chromatogramm der Urinprobe eines Rauchers, die sauer hydrolysiert, ausgeschüttelt und derivatisiert wurde (vgl. Kap. 7.3.5). Die Derivate wurden bei 60°C 25 min mit einer 65 μm PDMS/DVB-Faser aus dem Headspace extrahiert und mit GC-MS bestimmt (vgl. Tab. 29). Dargestellt sind die vergrößerten Ausschnitte aus dem Chromatogramm der Massenspur 127 m/z. Die Nummern der Verbindungen beziehen sich auf Tab. 30 auf Seite 158.



ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Analytik aromatischer Amine in wässrigen und biologischen Matrices“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.