

Analytik von phenolischen Substanzen und Epoxiden in Materialien mit
Lebensmittel- und/oder dermaletem Kontakt

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

staatl. geprüfter Diplom-Lebensmittelchemikerin, Silke Wermann
geboren am 9. Juni 1978 in Leipzig

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. T.J. Simat
Prof. Dr. techn. I. Steiner
Prof. Dr. rer. nat. B. Voit

Eingereicht am: 30. April 2008

Tag der Verteidigung: 11. Dezember 2008

Anfang bedeutet auch immer sich
ein Stück weit auf Unbekanntes
einzulassen.

Genau darin liegt die Chance.

Meiner Familie

Danke

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Thomas Simat am Institut für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Dresden im Zeitraum vom Nov. 2002 bis Aug. 2006 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Simat danke ich für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ingrid Steiner vom Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften der Technischen Universität Wien und Frau Prof. Dr. Brigitte Voit vom Leibnitz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V. für die freundliche Übernahme der Korreferate.

Bei Frau DLC Kirsten Dautel, Frau DLC Anita Skonieczny, Frau DLC Stephanie Jung, Herrn DLC Martin Heimrich und Herrn DLC Torsten Schulze möchte ich für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit danken. Vor allem Herr Heimrich leistete auch nach seiner Diplomarbeit einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit.

Der Firma Heinz gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung.

Dem Kooperationspartner *Valspar* danke ich für die Bereitstellung verschiedener kommerzieller Harze und Coatings und die Anfertigung von Modellcoatings. Mein Dank gilt auch der Firma *Hermal*, die uns mehrere Patch-Test-Substanzen zur Verfügung gestellt sowie finanziell unterstützt hat.

Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Messungen am Massenspektrometer danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Organische Chemie der TU Dresden danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren und die Durchführung von Elementaranalysen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Ulrike Kammann und Michael Vobach von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei des Institutes für Fischökologie in Hamburg für die Durchführung der Fischembryonentests bedanken.

Den Firmen *Bakelite® AG*, *Schenectady Europe S.A.S*, *Surface Specialities*, *UPPC AG*, *CVC-Specialty Chemicals*, *EMS-Primid* und *Huntsman Advanced Materials* gilt mein Dank für die Bereitstellung verschiedener Epoxyd- und Phenolharze.

Frau DLC Nadine Mittag und Frau DLC Nadine Paul möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit, ihren Anregungen und Diskussionsbereitschaft danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau DLC Nadine Mittag für die Durchführung der Neutralrottests und die kritische Durchsicht des Skripts.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der TU Dresden danke ich für das freundschaftliche und angenehme Umfeld und das gute Arbeitsklima.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung diesen Weg erst ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Chemie der Phenol- und Epoxidharze	3
2.1.1	Phenolharze	3
2.1.2	Epoxidharze	10
2.1.3	Vernetzung in Harzsystemen	14
2.1.4	Industrielle Einsatzgebiete	17
2.2	Toxikologische Tests und physiologische Reaktionen	18
2.2.1	Zytotoxizitätstest	18
2.2.2	Fischembryotest	20
2.2.3	physiologische Reaktionen bei oraler Aufnahme	23
2.2.4	Physiologische Reaktionen bei dermalen Kontakt	26
2.3	Rechtliche Grundlagen	29
2.3.1	Migration	29
2.3.2	spezifische Migrationslimits	31
2.4	Analytik	32
2.4.1	Phenolharze	32
2.4.2	Epoxidharze	40
3	Ergebnisse und Diskussion	48
3.1	Phenolharze	48
3.1.1	Quantifizierung der phenolischen Verbindungen in Migraten von Polyester- Phenol-Coatings und Bestimmung der Molekulargewichtverteilung	48
3.1.2	Identifizierung phenolischer Verbindungen in Phenolharzen	53
3.1.3	Vergleich der Zusammensetzung von Harz und Coatingmigrat	66
3.1.4	Charakterisierung von Phenolharzen zur allgemeinen Quantifizierung phenolischer Verbindungen in Migraten	68
3.1.5	Isolierung phenolischer Verbindungen	74
3.1.6	Flüssig/Flüssig-Extraktion	91
3.1.7	Toxikologische Untersuchungen phenolischer Verbindungen	94
3.2	Epoxidharze als Bestandteil von Coatings	116
3.2.1	Derivatisierung mit Cysteamin	116
3.2.2	Extraktion der Cysteaminderivate mittels Ionenaustauschermaterial	127
3.2.3	Kontrolle der Derivatisierung und Extraktion mittels Interne Standards	132
3.2.4	Quantifizierung der migrierenden epoxidhaltigen Verbindungen	133
3.2.5	Anwendung der optimierten Methode zur Isolierung epoxidhaltiger Verbindungen auf kommerzielle Coatingmigrat	134

3.3	Epoxide mit dermalen Kontakt	140
3.3.1	Synthese von 5-Dimethylamino-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin)	140
3.3.2	Derivatisierung von Epoxiden mit Dansylcysteamin.....	144
3.3.3	Analyse der in der dermatologischen EPOX-Studie 2000 eingesetzten Epoxidharze und Reaktivverdünner	150
3.3.4	Analyse weiterer Reaktivverdünner	160
3.3.5	Analytik von Handelsprodukten	165
3.3.6	Diskussion der Ergebnisse zur Analyse von Epoxiden mit dermalen Kontakt	168
4	Zusammenfassung.....	170
5	Experimenteller Teil.....	174
5.1	Material.....	174
5.2	Geräteverzeichnis	177
5.3	Methoden und Synthesen	179
5.3.1	Derivatisierung von Hydroxylgruppen mit Picolinsäure nach Mukaiyama.....	179
5.3.2	Acetylierung von Hydroxylgruppen.....	182
5.3.3	Dansylierung von phenolischen Hydroxylgruppen mit Dansylchlorid.....	185
5.3.4	Isolierung phenolischer Verbindungen	188
5.3.5	Darstellung von Phenololigomeren.....	192
5.3.6	Identifizierung und Quantifizierung von Epoxidverbindungen < 1000 Da aus Coatingmigraten durch Derivatisierung mit Cysteamin	199
5.3.7	Synthese von 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether	205
5.3.8	Identifizierung und Quantifizierung von epoxidhaltigen Verbindungen über die Derivatisierung mit 5-Dimethyl-amino-N(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin)	209
5.3.9	Synthese von 5-(Dimethylamino)-N-(2-mercaptoethyl)-1 naphthalin-sulfonamid (Dansylcysteamin)	213
5.4	Analysendaten	216
5.4.1	Fischembryotest.....	216
5.4.2	Neutralrottest	216
5.4.3	Identifizierte Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen in den Migraten verschiedener kommerzieller Epoxid-Coatings	217

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation, Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
ATP	Adenosintriphosphat
BADGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan, Bisphenol A-Diglycidylether
BADGE·HCl	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan
BADGE·2HCl	Bisphenol A-bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether
BADGE·HCl·H ₂ O	2-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]-propan
BADGE·H ₂ O	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]propan
BADGE·2H ₂ O	Bisphenol A-bis(2,3-dihydroxypropyl)ether
BDDGE	1,4-Butandiol diglycidylether
BFDGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]methan, Bisphenol F-Diglycidylether
BG	Bestimmungsgrenze
BGE	Butylglycidylether
BHMpK	2,6-Bis-(hydroxymethyl)-p-kresol
bidest.	bidestilliert
BPA	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan, Bisphenol A
BPF	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)methan, Bisphenol F
BPM	4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)-bisphenol, Bisphenol M
BuEtOH	Butoxyethanol
BuOH	Butanol
C12/C14-AGE	C12/C14-Alkylglycidylether
C13/C15-AGE	C13/C15-Alkylglycidylether
CGE	Cresylglycidylether
CHDMGE	Cyclohexandimethanoldiglycidylether
CLND	Chemiluminescent Nitrogen Detector, Chemilumineszenz-Stickstoff-spezifischer Detektor
DAD	Diodenarraydetektor
DansCyst.	Dansylcysteamin, 5-Dimethylamino-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid
DC	Dünnschichtchromatographie
2,4-DHMP	2,4-Dihydroxymethylphenol
DKG	Deutsche Kontaktallergiegruppe
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
DVB	Divinylbenzol
EC ₅₀	effect concentration, effektive Dosis (50 % der betroffenen Organismen)
ECH	Epichlorhydrin
EHGE	2-Ethylhexylglycidylether
ELSD	evaporative light scattering detector, Verdampfungslichtstredetektor
EFSA	European Food safty authority
EN	Europäische Norm
EP	Epoxidharz
ESI	electrospray ionisation, Electrospray-Ionisierung
et al.	et alii, und andere
EtEtOH	Ethoxyethanol
EtOH	Ethanol
Fällg.	Fällung
FH	Furanharz
FLD	Fluoreszenzdetektion
FID	Flammenionisationsdetektion
FKS	fötales Kälberserum
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatography
HDDGE	Hexandioldiglycidylether
HDMGE	Hexandiolmonoglycidylether
HDTGE	Hexandioltriglycidylether
2-HMP	2-Hydroxymethylphenol
4-HMP	4-Hydroxymethylphenol
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	inhibition concentration, Inhibitorkonzentration (50 % der betroffenen Organismen)
IR	Infrarot
IS	Interner Standard
ISO	International Standards Organization, Internationale Organisation für Normung
IVDK	Informationsverbund deutscher Kliniken
Kap.	Kapitel
K _{OW}	Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient
LC	liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LC ₅₀	lethal concentration, letale Dosis (50 % der betroffenen Organismen)
IV	

max.	maximal
2-MBA	2-Methylbenzylalkohol
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Meth.	methanolisch
MH	Melminharz
MSD	massenselektive Detektion
MtBE	Methyl-tert-Butylether
MTT-Test	Michael-Tilson-Thomas Test
MW	Mittelwert
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis, Massenzahl
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotids
NADPH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphats
NMR	nuclear magnetic resonance, kernmagnetische Resonanz
n.n.	nicht nachweisbar
NOAEL	no observed adverse effect level
NOEC	no observed effect concentration
NOGE	Novolakglycidylether
NP	normal phase, Normalphase
NPGDGE	Neopentylglycoldiglycidylether
P : F	Phenol/Formaldehydverhältnis
PE-PH-Coating	Polyester-Phenolcoating
PGE	Phenylglycidylether
PH	Phenolharz
PPGDGE	Polypropylenglycoldiglycidylether
PrOH	Propanol
PTBPGE	p-tert-Butylphenylglycidylether
QSAR	quantitative structure-activity relationships, quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen
Red.	Reduktion
RID	refraction index detector, Brechungsindexdetektion
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RP	reversed phase, Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SCF	Scientific Committee on Food - Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der Europäischen Kommission
SD	Standardabweichung

SEC	size exclusion chromatography, Größenausschlusschromatography
SPE	solid phase extraction, Festphasenextraktion
Tab.	Tabelle
tBuPh	tert-Butylphenol
THF	Tetrahydrofuran
TDI	tolerable daily intake
TIC	total ion current, Totalionenstrom
TMPTGE	Trimethylolpropantriglycidylether
UH	Harnstoffharz
UP	ungesättigtes Polyesterharz
UV	ultraviolett
UVD	Ultraviolett detektion
Verbg.	Verbindung
v/v	volume per volume, Volumenverhältnis

1 Einleitung und Zielstellung

Dank der heutigen in der Lebensmittelindustrie verwendeten Verpackungen sowie durch entsprechende Herstellungs- und Konservierungsverfahren und Transportmitteln steht dem Verbraucher eine große Vielfalt an Waren aus allen Regionen der Welt zur Verfügung. Die wichtigste Aufgabe der Verpackung ist dabei die Qualitätserhaltung des Lebensmittels. Das Packgut soll dabei u. a. vor mechanischen Beschädigungen, vor dem Befall von Insekten und Mikroorganismen, vor chemischen Verderb und vor Verlust an Inhaltsstoffen geschützt werden.¹ Wichtigstes Verpackungsmaterial 2005 für Lebensmittel war Weißblech.² Um dabei die Lebensmittel vor einer Anreicherung von Metallionen zu schützen, wird der überwiegende Teil der Konservendosen mit einer Lackschicht versehen. Dabei finden u. a. Epoxidharze und Phenolharze als Lackrohstoffe in Funktion als Basisharz oder Vernetzermponente Verwendung. Infolge des Kontaktes der Konservendoseninnenbeschichtung mit dem Lebensmittel kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zur Migration von meist niedermolekularen, nicht umgesetzten Harzbestandteilen aber auch von Reaktionsprodukten der Härtung kommt. Während die Migrationsvorgänge von Epoxidverbindungen analytisch und auch bezüglich der Reaktion mit Lebensmittelbestandteilen, bereits in großen Umfang untersucht wurden, sind Untersuchungen zu migrierenden phenolischen Verbindungen bisher im weitaus geringeren Maße dokumentiert. Schwerpunkt des ersten Teiles dieser Arbeit war deshalb die Analytik migrierender Phenole, die aufgrund der verschiedenen Rohstoffe und Herstellungsverfahren im Gegensatz zu den Epoxiden wesentlich vielfältiger sind. Dabei galt es, Analysenmethoden zur Identifizierung und Quantifizierung einzelner Phenole als auch phenolischer Verbindungen in Summe zu entwickeln. Während für wenige Verbindungen rechtliche Regelungen in Form von spezifischen Migrationslimits vorliegen, gibt es für mehrkernige Phenole keine gesetzlichen Grenzwerte. Hinsichtlich des toxikologischen Potentials von Phenolen wurden in bisherigen Arbeiten daher vor allem Monomere, wie halogenierte Derivate oder Chlorbenzole untersucht, höhermolekulare Verbindungen blieben dagegen bisher unberücksichtigt.^{3, 4} Anhand von Standardsubstanzen und selbst synthetisierten Oligomeren sollten mittels zweier Toxizitätstest erste Einblicke in die toxikologische Relevanz dieser Verbindungen erhalten werden.

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich der Analyse von Epoxidverbindungen. In der amtlichen Überwachung beschränkt sich die Analytik von Epoxidverbindungen bisher auf die Bestimmung rechtlich geregelter Einzelsubstanzen. Das gesamte Reaktionspotential durch weitere im Migrat enthaltene Verbindungen mit intakten Oxirangruppen ist so nicht bestimmbar. Es sollte deshalb eine Analysenmethode entwickelt werden, die es ermöglicht, innerhalb der Fraktion der

¹ Piringer O.G., Verpackungen für Lebensmittel - Eignung, Wechselwirkungen, Sicherheit, Weinheim; New York, Basel, Cambridge: VCH 1993.

² Rasselstein GmbH (2007), Informations-Zentrum Weißblech; Werkstoff, Marktdaten, Lebensmittel (2005) in Prozent (Prognose), <http://www.izw.de/Marktdaten.25.0.html>; Stand: 03.10.2007.

³ Kammann, U.; Vobach, M.; Wosniok, W., Toxic effects of brominated indols and phenols on zebrafish embryos, Arch Environ Contam Toxicol 2006, Vol. 51, No. 1, 97 - 102.

⁴ Kasokat, T.; Nagel, R.; Ulrich, K., The metabolism of phenol and substituted phenols in zebra fish, Xenobiotica 1987, Vol. 17, No. 10, 1215 - 1221.

migrierenden Substanzen unter 1000 Da, unabhängig von der strukturellen Identifizierung von Einzelsubstanzen, alle Verbindungen mit intakten Oxirangruppen zu bestimmen und in Summe zu quantifizieren.

Neben der Verwendung als Lackrohstoffe für Konservendoseninnenbeschichtungen werden Epoxidharzsysteme, ebenso wie die Phenolharze in der Industrie aufgrund ihrer Eigenschaften in vielen weiteren Materialien wie z.B. Grundierungen, Füllmassen, Lacken oder Klebstoffen, die sowohl im häuslichen als auch im gewerblichen Bereich Anwendung finden, eingesetzt. Mit dieser zunehmenden Verwendung epoxidhaltiger Materialien wurde jedoch auch ein Anstieg an berufsbedingten allergischen Kontaktekzemen beobachtet.⁵ Die Diagnose erfolgt dabei über einen Epikutantest (Patch-Test), für den in der Standardreihe ein Bisphenol A basierendes Epoxidharz und in der erweiterten Testreihe „Kunstharze/Kleber“ verschiedene Reaktivverdünner verwendet werden. In den epoxidhaltigen Materialien der Bauchemie sind jedoch weitere aromatische, aliphatische und auch cycloaliphatische Glycidylether enthalten. Von ihnen ist ebenfalls bekannt, dass sie Kontaktallergien auslösen können, wobei auch Kreuzreaktionen beobachtet wurden.⁶ Über die genaue chemische Zusammensetzung der in den Patchtest's verwendeten Epoxidverbindungen ist im Gegensatz zu den möglichen dermalen Reaktionen wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit galt es daher im Weiteren, die in den Epikutantests eingesetzten epoxidischen Rohmaterialien zu charakterisieren und diese mit Materialien zu vergleichen, die von der Industrie verwendeten werden.

⁵ Umgang mit Epoxidharzen, Workshop des Unterausschusses IV Arbeitsplatzbewertung - 25. Juni 2001, Bau-Berufsgenossenschaft Frankfurt am Main.

⁶ Geier, J.; Uter, W.; Lessmann, H.; Hiller, U.; Goergens, U.; Kersting, K.; Fuchs, T.; Schnuch, A, Kontaktallergie gegen Epoxidharze - ein unterdiagnostiziertes Problem, Allergo J 2003, Vol. 12, 323 - 328.

2 Theoretischer Teil

2.1 Chemie der Phenol- und Epoxidharze

Die Grundlage für die spätere Entwicklung der Phenolharze zu den ersten vollsynthetischen Kunststoffen der Welt legte Baeyer⁷ 1872 mit der Kondensationsreaktion von Phenol mit Formaldehyd. Jedoch erst 3 Jahrzehnte später wurde die lange Zeit unbeachtete Reaktion von Baekeland wieder aufgegriffen. Sie ist die Grundlage seiner Entdeckung des allgemeinen Prinzips der Herstellung hochvernetzter duroplastischer Kunststoffe, welche unter anderem im „Hitze- und Druckpatent“ lizenziert wurde.⁸ Dieses bis heute gültige Prinzip besteht darin, zunächst oligomere Zwischenverbindungen zu synthetisieren, die noch schmelz- und formbar sind und die anschließend in der eigentlichen Formgebungsstufe in einen hochmolekularen und unschmelzbaren Zustand überführt werden.⁹

Die durch Polyaddition entstehenden Epoxidharze zählen im Gegensatz zu den Phenolharzen zu den jüngeren Kunstharzen. Obwohl unter anderem von Schlack¹⁰ in den frühen 30iger Jahren des 20. Jh. Patente zur Gewinnung epoxidgruppenhaltiger Harze angemeldet wurden, sind die Forschungsarbeiten von Castan¹¹ 1938 als Ausgangspunkt für die späteren Entwicklungen auf dem Gebiet der Epoxidharze anzusehen. Der wesentliche Punkt seiner Arbeiten war dabei jedoch nicht die Herstellung von Polyepoxidverbindungen sondern ihre Vernetzung zu Duroplasten durch verschiedene Härter.

Nach den ersten Schritten und mehreren Patentanmeldungen wurden in den folgenden Jahren die Herstellungsverfahren verbessert, durch Modifizierungen neue Harztypen entwickelt, verschiedenartige Härter erprobt und umfassende Untersuchungen zur Ermittlung von Eigenschaftszusammenhängen und zur Unterscheidung von Anwendungsgebieten durchgeführt. Aufgrund ihrer technischen Eigenschaften finden heute beide Harze, in der Regel in Kombination mit anderen Erzeugnissen, breite Anwendung in verschiedensten Industriezweigen.

2.1.1 Phenolharze

Nach DIN EN ISO 10082 sind Phenolharze definiert als Polykondensationsprodukte von phenolischen Verbindungen mit Aldehyden.¹²

Bezüglich der phenolischen Komponente wird eine Vielzahl von Verbindungen, wie Phenol, Kresole, Xylenole, Alkylphenole, oder Bisphenole in der herstellenden Industrie eingesetzt.

⁷ Baeyer, A.v.; Über die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen (und aromatischen Kohlenwasserstoffe), Ber. 1872, Vol. 5, 25 - 26, 280 - 282, 1094 - 1100.

⁸ Baekeland, L.H., Deutsches Reichspatent 233 803, Verfahren zur Herstellung von Kondensationsprodukten aus Phenolen und Formaldehyd, 31.01.1908.

⁹ Kittel, H., Lehrbuch der Lacke und Beschichtungen, Band 2 - Bindemittel für lösemittelhaltige und lösemittelfreie Systeme, 2. erweiterte und neubearbeitete Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig 1988.

¹⁰ Schlack, P. (IG-Farbenindustrie), Deutsches Reichspatent 676 117, 11. 12. 1934.

¹¹ Castan P. (Gebrüder de Trey AG), Schweizer Patent 211 116, 23. 08. 1938.

¹² DIN EN ISO 10082, Kunststoffe – Phenolharze – Klassifizierung und Prüfverfahren, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Dezember 2000, Beuth Verlag, Berlin.

Dagegen fällt bei den Aldehyden die Wahl fast ausschließlich auf Formaldehyd, was sich mit einer signifikant geringeren Reaktionsgeschwindigkeit von höheren Aldehyden mit Phenolen erklärt.¹³

Die Funktionalität der phenolischen Komponente bestimmt das Resultat der Polykondensation. Dreidimensionale Netzwerke entstehen folglich aus trifunktionellen Phenolen, lineare Strukturen dagegen bei der Verwendung ortho- oder para-substituierter Verbindungen. Die Eigenschaften der Phenolharze können sehr vielfältig sein und ergeben sich aus unzähligen Modifizierungsmöglichkeiten.

In Abhängigkeit vom Katalysator und dem molaren Verhältnis der phenolischen Verbindung zum Aldehyd unterscheidet man zwei Harztypen, die Resole und die Novolake.

Novolake und Resole

Ausgangspunkt der Polykondensation ist immer der elektrophile Angriff des Formaldehyds in ortho- oder para Position des Phenols (saure Katalyse) bzw. des Phenolations (basische Katalyse), und damit die Bildung von Hydroxymethylphenolen (Abb. 2.1).¹⁴

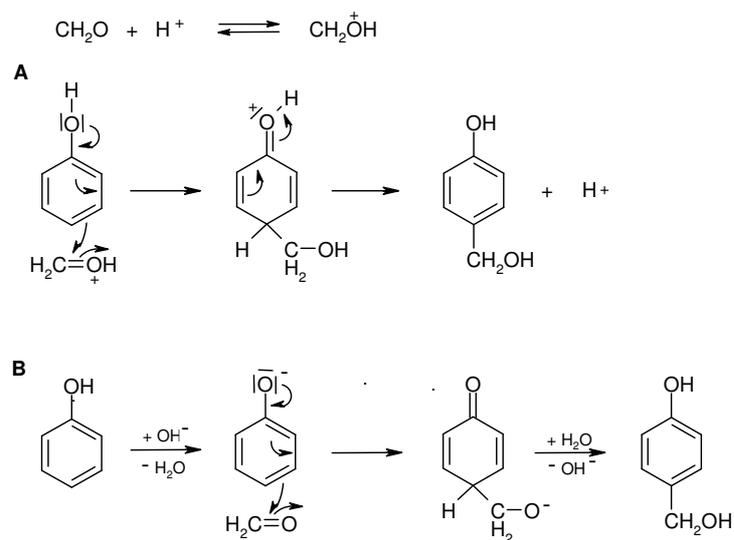


Abb. 2.1: Synthese von Hydroxymethylphenolen katalysiert durch Säuren (A) und Basen (B)

Die Herstellung von *Novolaken* erfolgt bei einem Unterschuss an Formaldehyd ($P : F = 1 : < 1$) und bei überwiegend sauer katalysierter Reaktionsführung. Durch die höhere Reaktivität der hydroxymethyl-substituierten Phenole im Vergleich zu Phenol und ihrer Instabilität im saureren Medium gehen diese sehr schnell in methylenverbrückte Verbindungen über (Abb. 2.2).

¹³ Gradziella, A., Pilato, L.A., Knop, A., Phenolic resins – Chemistry, Applications, Standardization, Safety and Ecology, 2nd completely revised Edition, Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1999.

¹⁴ Hesse, W., Phenolic Resins, In: Elvers, B.; Hawkins, S.; Schulz, G. eds. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Volume A 19 Parkinsonism Treatment to Photoelectricity, 5th completely revised Edition, Weinheim, New York: VCH 1991.

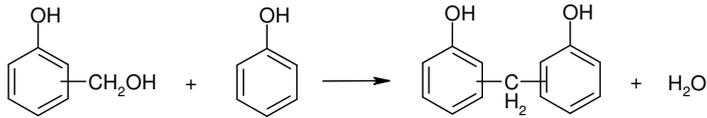
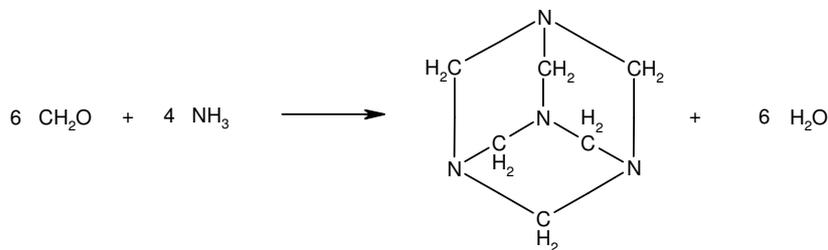
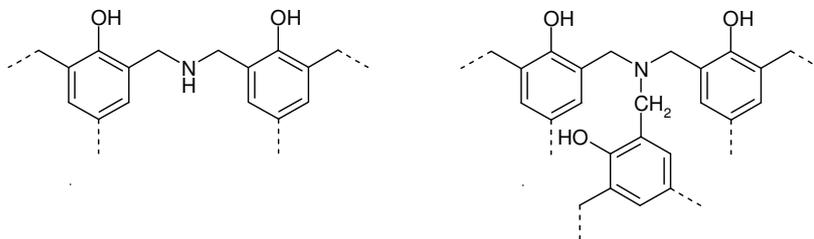


Abb. 2.2: Ausbildung von Methylenebrücken

Durch den Überschuss an phenolischen Verbindungen besitzen die löslichen und unverändert schmelzbaren Novolake keine reaktiven Gruppen oder Brückenbindungen und zählen deshalb zu den indirekt härtbaren Produkten. D. h. erst mit dem Einsatz eines Härtungsmittels, z. B. Hexamethylentetramin (Hexamin), welches die zur Vernetzung dienenden Brückenbindungen liefert, ist eine Überführung in unlösliche Harze möglich. Die besondere technische Bedeutung des Hexamin resultiert dabei aus seiner Bildung aus NH_3 und CH_2O , bei der bereits Kondensationswasser frei wird.

Abb. 2.3: Bildung von Hexametylentetramin¹⁵

Bei der anschließenden Härtung werden nur geringe Menge NH_3 aber kein H_2O frei, wodurch Wassereinschlüssen im Vernetzungsgitter vermieden werden. Der im Hexamin gebundene Formaldehyd sowie ein Teil des NH_3 werden vor allem als Dimethylamin- als auch als Trimethylaminbrücken eingebaut (Abb. 2.4). Bei der Hitzehärtung (150 – 180 °C) werden diese in Methylengruppen überführt und NH_3 abgespalten.

Abb. 2.4: Zwischenprodukte bei der Novolakhärtung mit Hexamin, modifiziert¹⁵

¹⁵ Bachmann, A.; Müller, K., Phenoplaste, 1. Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffchemie, Leipzig 1973.

Im Gegensatz zu den Novolaken liegt bei der Herstellung der *Resole* das Molverhältnis von Phenol zu Formaldehyd im Reaktionsansatz auf Seiten des Aldehyds. Katalysiert wird Ihre Synthese durch Basen oder Salze schwacher Säuren oder Basen.¹⁴

Durch den Überschuss an Formaldehyd ist es möglich, dass bei der anfänglichen Bildung der Hydroxymethylphenole in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen durch die Besetzung aller freien reaktionsfähigen Stellen ein Isomerenmisch verschiedener mono-, di-, und trisubstituierter Phenole entsteht (Abb. 2.5).

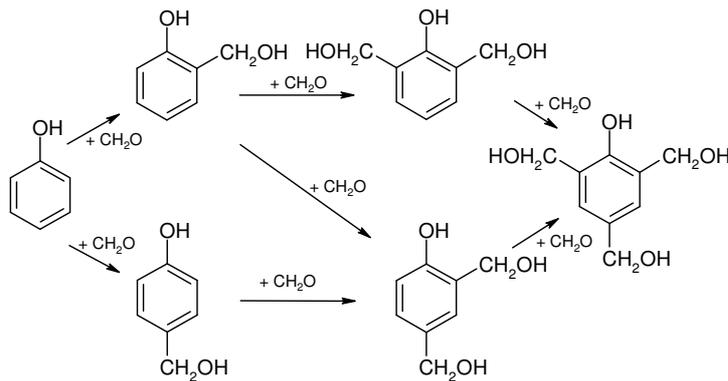


Abb. 2.5: Bildung von Hydroxymethylphenolen¹³

Bei gering temperierter Reaktion gehen die methylolgruppenhaltigen Phenole unter Wasserabspaltung in Dimethylenethergruppen verknüpfte Verbindungen über. Diese Etherbrücken können anschließend ohne die Einwirkung von Katalysatoren durch Elimination von Formaldehyd in Methylenbrücken konvertieren (Abb. 2.6).

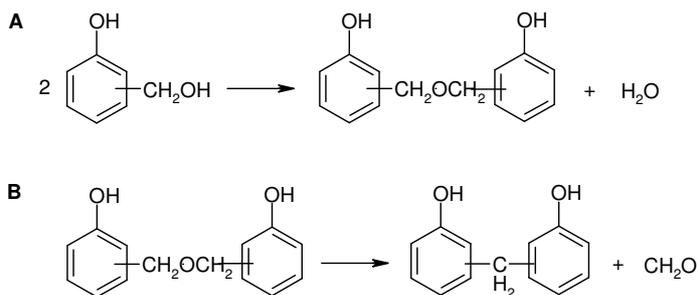


Abb. 2.6: mögliche Reaktion von methylolsubstituierten Phenolen zu Dimethylenetherbrücken (A) sowie deren Abbau zu Methylenbrücken (B)

Aufgrund der im Molekül enthaltenen reaktiven Gruppen zählen die Resole zu den eigenhärtenden Harzen, d.h. eine Überführung in gehärtete Produkte ist ohne Zusatz von Härtungsmitteln z.B. allein durch Erwärmen möglich.

Im Laufe der Vernetzung zu höher kondensierten Produkten durchlaufen die Phenolharze fließend verschiedene morphologische Zustände mit entsprechenden unterschiedlichen Eigenschaften. Es ist dabei möglich die Kondensation beliebig oft zu unterbrechen und wieder weiter zuführen bis der

gewünschte Charakter des Harzes erreicht ist. Im Ausgangszustand (A – Zustand) sind sowohl die Resole als auch die Novolake flüssig oder schmelzbar und in einer Reihe von organischen Lösungsmitteln löslich. Für die Weiterführung der Polykondensation sind wie bereits erwähnt für die Novolake Härtungsmittel notwendig. Im Folgenden gehen beide in einen Zwischenzustand (B – Zustand) über. Diese so genannten Resitole sind quellbar und in der Wärme noch verformbar. Den Endzustand (C – Zustand) der Vernetzungsreaktion bilden die hochmolekularen, unlöslichen und unquellbaren Resite. Sie besitzen eine hohe mechanische Festigkeit und Chemikalienresistenz.¹⁶ Die Resitgitter der Novolake sind in den meisten Fällen aufgrund der Härtungsbedingungen weniger dicht vernetzt als die von ausgehärteten Resolen.

Scharfe Grenzen sind chemisch zwischen den einzelnen Kondensationsstufen nicht zu ziehen.

Schon nach kurzer Zeit und verstärkt durch thermische Belastung tritt bei den Phenolharzen eine gelb bis braune Verfärbung ein. Dies wird von Hultsch et al.¹⁷ durch die Bildung von Chinonmethiden durch intramolekulare Wasserabspaltung während des Härtungsprozesses erklärt. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sowohl Nucleophilen als auch Elektrophilen gegenüber sind Chinonmethide sehr unbeständig. Bei Abwesenheit anderer reaktionsfähiger Partner erfolgt die Stabilisierung durch gegenseitige Addition zu Di-, Tri- und Polymeren (Abb. 2.7).¹⁸

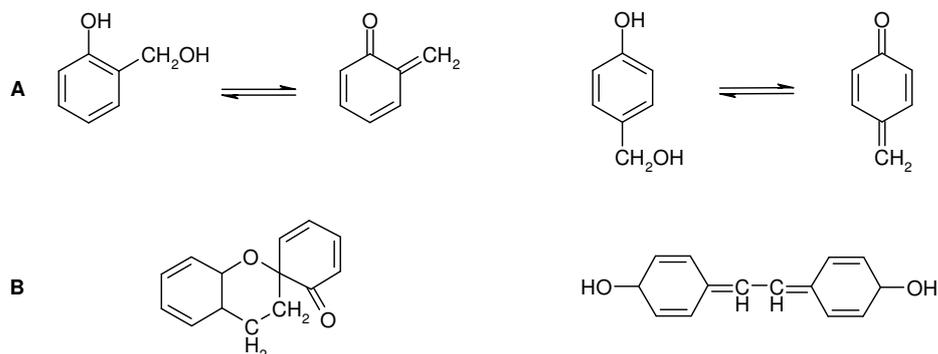


Abb. 2.7: Bildung von Chinonmethiden (A) sowie deren entsprechende Dimere (B)

Vor allem die bei der Dimerisierung der o-Chinonmethiden durch eine Diels-Alder-Reaktion gebildeten cyclischen Chinolether sind stark gelb gefärbt.

Modifizierungsmöglichkeiten

Um die Phenolharze einem breiten Bereich von Anwendungen zugänglich zu machen, können ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften auf verschiedenste Art modifiziert werden.

¹⁶ Bakelite AG, Bakelite® - Phenolharze, Leitfaden, Produktauswahl Anwendung, Broschüre der Bakelite AG, www.bakelite.de.

¹⁷ Hultsch, K., Studien auf dem Gebiet der Phenol-Formaldehyd-Harze, II. Mitteil.: Chinonmethide als Zwischenprodukte bei der Phenolharz-Härtung, Chem. Ber. 1941, Vol. 74, Nr. 6, 898 - 904.

¹⁸ Hultsch, K. Chemie der Phenolharze, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1950.

a) Wahl des Katalysator

Sowohl bei Novolaken also auch bei den Resolen ist das Verhältnis der Substitutionen in ortho- oder para-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe stark abhängig von der Wahl des eingesetzten Katalysators. So nimmt bei den im pH-Bereich von etwa 4 - 9 hergestellten Novolaken die bevorzugte Addition des Formaldehydes in ortho-Position im Vergleich zur para-Position sowie die Bildung von o,o'-Verknüpfungen mit folgender Reihe an verwendeten Metallhydroxiden zu: $K < Na < Li < Ba < Sr < Ca < Mg$.¹⁹ Auch bei der Verwendung der Nebengruppenelemente Cu, Cr, Mn, Ni und Co konnte dieser ortho-dirigierende Effekt beobachtet werden.²⁰ Die Bildung dieser so genannten „high-ortho“-Novolake wird dem Auftreten von intermediären Chelat-Komplexen zugeschrieben (Abb. 2.8). Das Verhältnis von ortho zu para-Substitution ist dabei umso größer, je größer die Tendenz der Metallionen zur Bildung stabiler Chelatkomplexe ist.

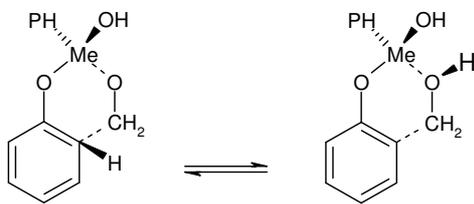


Abb. 2.8: Chelateffekt am Beispiel der Metallhydroxyde der 2. Hauptgruppe²¹

Vorteil dieser „high-ortho“-Novolake ist der hohe Anteil der reaktiven p-Positionen, die somit für eine schnelle Aushärtung z.B. mit Hexamin frei bleiben.

Bei den Resolen hat der eingesetzte Katalysator ebenfalls Einfluss auf den Mechanismus und die Kinetik der Formaldehyd-Phenol-Reaktion. Die Abnahme des Formaldehyds während der Umsetzung steigt in gleicher Reihenfolge der oben genannten Metallionen. Grenier-Loustalot et al.²² konnten zeigen, dass dies hauptsächlich auf die Ladung und den Ionenradius des hydratisierten Metallkations zurückzuführen ist.

Etwas schwächer in der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu Natriumhydroxid sind die ebenfalls als basische Katalysatoren eingesetzten Trialkylamine. Ihr Vorteil liegt in den resultierenden Harzeigenschaften. Ihre längere Gelierungszeit wirkt sich vor allem während der Lagerung und dem Transport vorteilhaft aus. Außerdem verbrennen sie im Gegensatz zu Metallhydroxiden rückstandslos.²³

¹⁹ Peer, H.G., The reaction of phenol with formaldehyde. II. The ratio of ortho- and para-hydroxymethylphenol in the base-catalyzed hydroxymethylation of phenol, *Rec trav chim* 1959, Vol. 78, 851 - 863.

²⁰ Peer, H.G., The reaction of phenol with formaldehyde. III. Selective hydroxymethylation of phenols at the ortho-position, *Rec trav chim* 1960, Vol. 79, 825 - 835.

²¹ Burkhart, T., Oberressl, P., Oldring, P.K.T., Volume V, Part I, *The Chemistry and Application of Phenolic Resins or Phenoplasts*, John Wiley and Sons, Chichester, New York, Weinheim, Toronto Singapore 1998.

²² Grenier-Loustalot, M.-F.; Larroque, S.; Grande, D.; Grenier, P., Phenolic resins: 2 Influence of catalyst type on reaction mechanisms and kinetics, *Polymer* 1996, Vol. 37, No. 8, 1363 - 1369.

²³ Kaledkowski, B.; Hepter, J., Synthesis of phenol-formaldehyde resol resin in the presence of tetraalkylammonium hydroxides as catalysts, *Polymer* 2000, Vol. 41, 1679 - 1684.

b) Veretherung der methylolischen und phenolischen Hydroxylgruppen

Plastifizierte und elastifizierte Phenolharze werden hauptsächlich durch Veretherung erhalten. Dies ist stets mit einer verminderten Reaktivität und somit auch mit einem sinkenden Grad der Vernetzung der Harze verbunden. Andererseits steigen jedoch die Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln und die Mischbarkeit mit natürlichen Harzen. Werden sowohl die phenolischen als auch die methylolischen OH-Gruppen verethert, entstehen z.B. Harze, die mit Weichmachern und Polymerisaten gut verträglich sind.¹⁵

Die Veretherung der Hydroxymethylgruppen, erfolgt überwiegend mit n-Butanol oder Isobutanol (Abb. 2.9 A). Die Kondensationsreaktion verläuft dabei parallel zur Bildung der Methylenbrücken. Der Ablauf der beiden in Konkurrenz stehenden Reaktionen lässt sich über den Anteil des Alkohols sowie den pH-Wert steuern. Das dabei entstehende Wasser wird mittels azeotoper Destillation aus dem Reaktionsansatz entfernt. Erst bei Abspaltung des Veretherungsalkohols sind die Methylolgruppen wieder reaktionsfähig, wodurch die Vernetzung erst bei sehr hohen Temperaturen und verlangsamt abläuft. Dadurch wird die Eigenkondensation des Resols verzögert und gleichzeitig die Reaktion mit andern Partnern gefördert.⁹

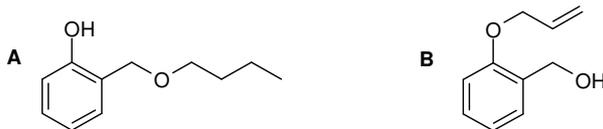


Abb. 2.9: mit n-Butanol (A) und Allylchlorid (B) verethertes Resol

Die als Phenoetherresole bekannten Resole entstehen bei der Veretherung der phenolischen Hydroxylgruppe mit starken Elektrophilen, wie z.B. Benzylchlorid, Allylchlorid, Epichlorhydrin (ECH) oder Dialkylsulfate, unter alkalischen Bedingungen (Abb. 2.9 B).²¹ Dabei liegt das Hauptaugenmerk vor allem auf der Reduzierung der nachteiligen Eigenschaften, die mit den freien phenolischen OH-Gruppen verbunden sind. Dies sind z. B. eine erhöhte Oxidationsanfälligkeit, die Tendenz zur Vergilbung der Harze sowie die Unbeständigkeit gegen Alkali.¹⁴

d) Veresterung

Eine weitere Möglichkeit plastifizierte Phenolharze zu erhalten ist die Veresterung mit epoxidgruppenhaltigen, ungesättigten Ölen, Fettsäuren oder Fettalkoholen sowie ihren Derivaten. Die Addition dieser epoxidierten Verbindungen kann dabei sowohl an den methylolischen als auch an den phenolischen OH-Gruppen erfolgen. Die Veresterung der Methylolgruppen ist vor allem für die Herstellung wasserlöslicher Lackkombinationen von Bedeutung. Dafür werden hauptsächlich ungesättigten Fettsäuren sowie hydroxylgruppenhaltige und carboxylgruppenhaltige Polyester, mit ungesättigten Säuren eingesetzt. Durch die Veresterung von Novolaken mit anorganischen Säuren, wie z. B. H_3PO_4 , $B(OH)_3$ oder phosphoriger Säure werden Harze mit spezifischen Eigenschaften, wie Wärme- und Flammenbeständigkeit und guter elektrischer sowie mechanischer Beschaffenheit erhalten.¹⁵

c) Cokondensatbildung

Eine andere Möglichkeit Phenolharze zu verändern, besteht in der Modifizierung mit N-, Si-, P-, O- oder S-haltigen Verbindungen, das heißt neben Formaldehyd und Phenol sind noch weitere Ausgangsprodukte an der Kondensation der Phenolharze beteiligt. Sowohl Si-haltige Phenolharze als auch Harze mit P-haltigen Verbindungen zeichnen sich durch eine hohe Temperaturbeständigkeit aus. S-haltige Polymere besitzen eine bemerkenswerte Elastizität bzw. Plastizität und werden als synthetische Gerbstoffe verwendet. Am bekanntesten sind jedoch die Phenol-Harnstoff-Formaldehyd-Harze und die Kombinationen aus Phenol mit Melamin und Formaldehyd, welche vorwiegend in der Klebstoffindustrie eingesetzt werden.¹⁵

2.1.2 Epoxidharze

BADGE-Oligomer-Synthese

Nach DIN EN 55650 sind Epoxidharze synthetische Harze, welche meist aus Epichlorhydrin und Bisphenol A (BPA) oder durch Epoxidierung bestimmter olefinischer Doppelbindungen hergestellt werden.²⁴

Die von der Industrie am häufigsten eingesetzten Epoxidharze basieren auf Diglycidylethern zweiwertiger Phenole. In begrenztem Umfang werden jedoch auch Poly- und Monoglycidylether von Phenolformaldehyd-Novolaken und aromatischen sowie mehrwertigen aliphatischen Alkoholen verwendet, wobei letztere überwiegend als reaktive Verdünnungsmittel im zusammengesetzten Epoxidharzsystem fungieren.

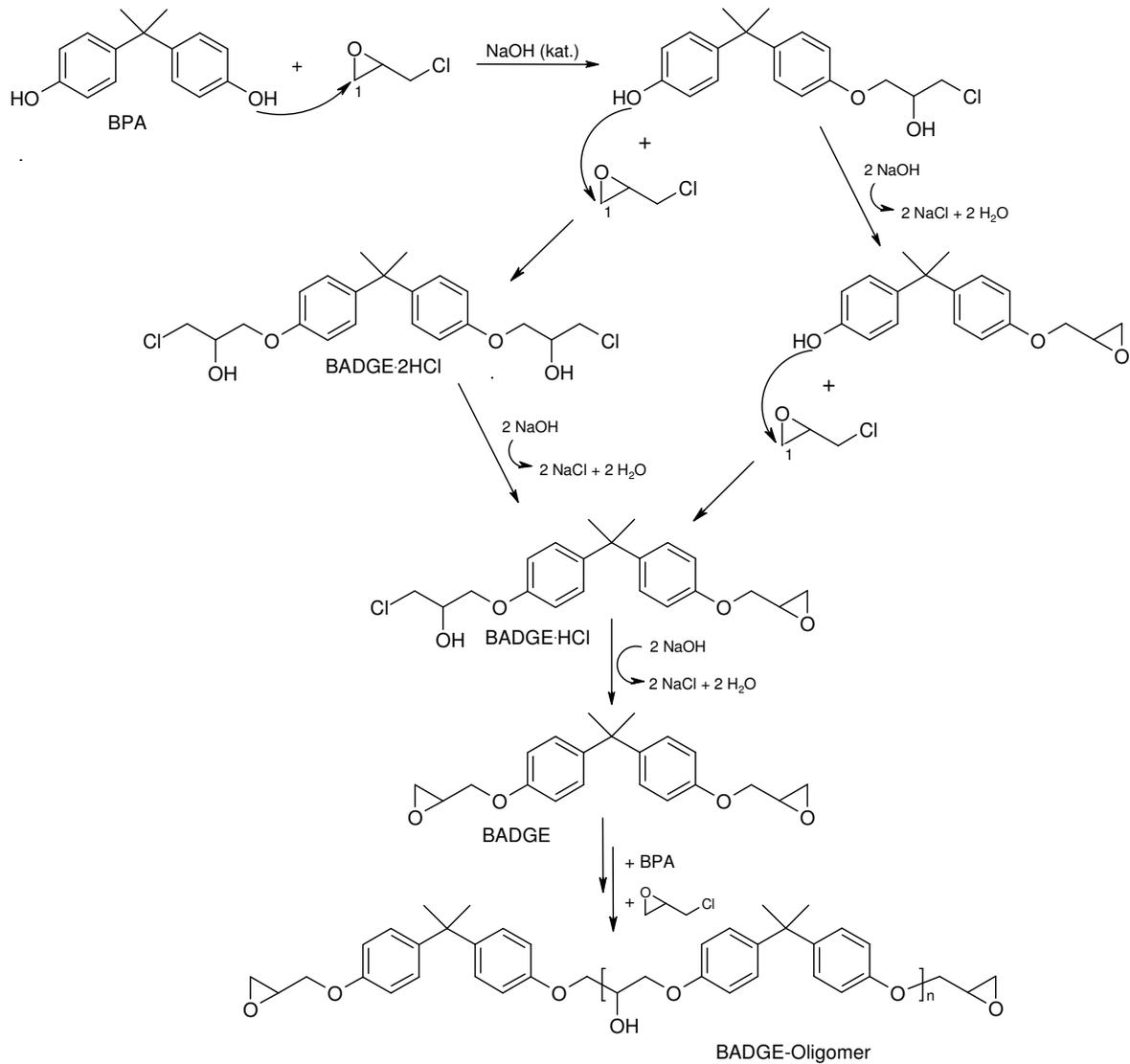
BPA ist in 75 % der Herstellungsprozesse der phenolische Grundbaustein der Epoxidharze.²⁵ Das, unter dem Einfluss katalytischer Mengen an Natriumhydroxid gebildete Phenolat reagiert über nukleophile Addition bevorzugt mit dem weniger sterisch gehinderten C1 Atom des Epichlorhydrin unter Ringöffnung. Die dabei entstehenden hydrochlorierten Intermediate Bisphenol-A-(3-chloro-2-hydroxypropyl)glycidyletherether (BADGE·HCl) und Bisphenol-A-bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether (BADGE·2HCl) gehen anschließend durch stöchiometrische Umsetzung mit Natriumhydroxid in Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) über (Abb. 2.10). Dies erfolgt über eine nukleophile Substitution des Chlorids durch den im alkalischen Milieu aktivierten Alkohol (Alkoholation).⁹ Werden weitere BPA-Moleküle an die Epoxidgruppen addiert, entstehen neue Etherbindungen und zugleich sekundäre alkoholische Hydroxylgruppen. Somit bildet sich durch abwechselnde Addition und Kondensation ein linearer Polyether von BPA.²⁶

Das durchschnittliche Molekulargewicht ist dabei abhängig vom eingesetzten Epichlorhydrin/Bisphenol A – Verhältnis. Je geringer dieses Verhältnis ist, desto größer ist die Anzahl an Monomereinheiten im Molekül.

²⁴ DIN EN ISO 4618, Beschichtungsstoffe - Begriffe, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. März 2007, Beuth Verlag, Berlin.

²⁵ Pham, H.Q.; Marks, M.J., Epoxy resin, In: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley VCH-Verlag GmbH & Co KGaA, 2006.

²⁶ Jahn, H., Epoxidharze, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1969.

Abb. 2.10: Mechanismus von BADGE-Oligomer-Synthese, modifiziert²⁷

Nebenreaktionen

Jedoch nicht alle im Harz enthaltenen Verbindungen sind Epoxide. Die häufigste der möglichen Folge- und Nebenreaktionen ist die Hydrolyse der Epoxidgruppe. Des Weiteren kann ein nukleophiler Angriff am C2-Kohlenstoff des Epochlorhydrins zur Ausbildung eines 1,3-Chlorhydrins führen. Die Addition von Epichlorhydrin mit sekundär alkoholischen Hydroxylgruppen ist ebenfalls eine denkbare Nebenreaktion (Abb. 2.11).²⁸

²⁷ Braun, D.; Lee, D.W., Über einige Nebenreaktionen bei der Herstellung von Epoxidharzen aus Bisphenol A und Epichlorhydrin, *Angew Makromol Chem* 1976, Vol. 51, No. 766, 11 - 24.

²⁸ Ellis, B., *Chemistry and Technology of Epoxy resins*, Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, N.Y., Melbourne, Madras, 1993.

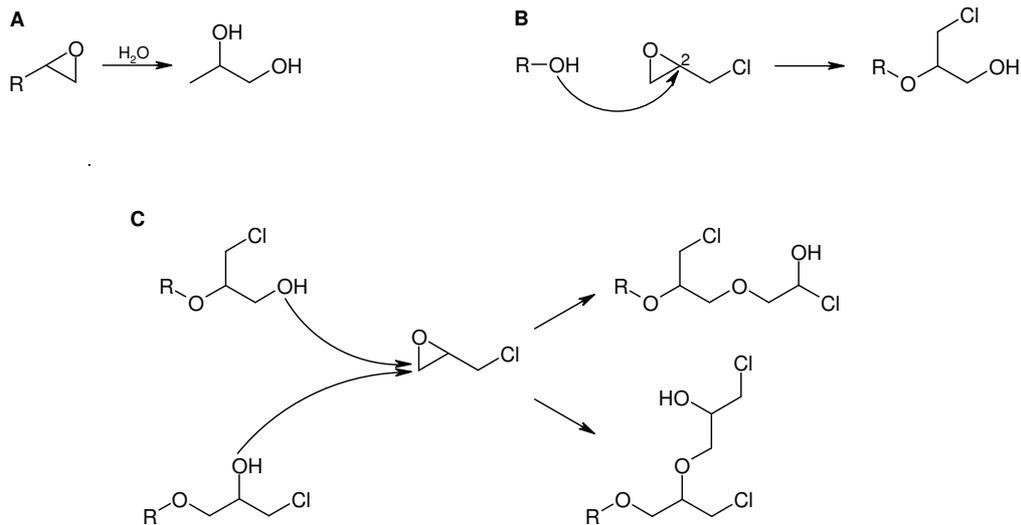


Abb. 2.11: Nebenreaktionen bei der Synthese von Epoxidharzen, A... Hydrolyse, B... Bildung von 1,3-Chlorhydrinen, C...Reaktion mit sekundären Alkoholen

Die Bildung von 1,3-Chlorhydrinen wird vor allem bei der Epoxidierung von aliphatischen Alkoholen beobachtet. Zum Ausgleich der geringen Reaktivität dieser Alkohole, ist es nötig den Epoxidring des Epichlorhydrins durch die Verwendung von Lewissäuren zu aktivieren. Durch die saure Katalyse kommt es zur Protonierung des Epoxidringes und folglich zur Bildung einer alkoholischen Hydroxylgruppe, die im Folgenden die nucleophile Addition begünstigt. Durch die schwache Nucleophilie des angreifenden Alkohols ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion die Bindungsspaltung des Epoxidringes, die somit weiter fortgeschritten ist als die Bindungsneubildung. Daraus resultiert, dass beide Ringkohlenstoffatome eine partielle positive Ladung tragen können. Diese wird jedoch vorwiegend an dem C-Atom lokalisiert, an dem sich ein elektronenschiebender Substituent z. B. ein Alkylrest befindetet, so dass bevorzugt 1,3-Chlorhydrine gebildet werden (Abb. 2.12).⁹

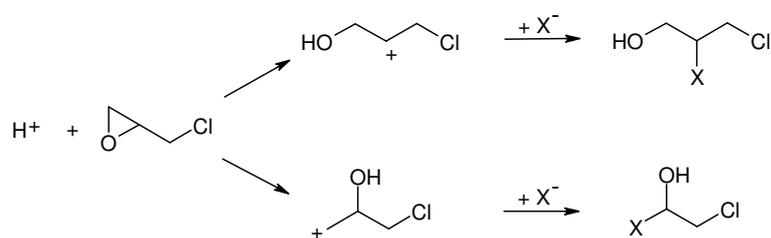


Abb. 2.12: sauer katalysierte Bildung von Chlorhydrinen, X...zu epoxidierender Alkohol, modifiziert⁹

Diese sind bei der folgenden Laugenbehandlung nicht in der Lage Oxirangruppen zu bilden, womit es zum Einbau von Chlor ins Harzgerüst kommt. Durch die ähnliche Reaktivität sowohl der Hydroxylgruppen von 1,2- und 1,3-Chlorhydrinen als auch der zu epoxidierenden Alkohole, entsteht eine Konkurrenz um die Epoxidgruppe des Epichlorhydrins.

NOGE-Harze und Reaktivverdünner

Weitere und aufgrund der geringeren Viskosität oft mit BPA-Harzen in Mischung verwendete Epoxidharze sind Novolakglycidylether (NOGE-Harze). Diese multifunktionalen Epoxidharze basieren auf den Säure katalysierten Phenol-Formaldehyd-Novolaken. Die diesbezüglich am häufigsten verwendete Grundsubstanz ist Bisphenol F (BPF) (Abb. 2.14).

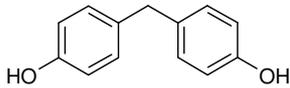


Abb. 2.13: p,p-BPF

Die Umsetzung der phenolischen Hydroxylgruppen des Harzes mit Epichlorhydrin erfolgt analog der Darstellung von BADGE, wobei jedoch mehr als zwei reaktionsfähige phenolische Hydroxylgruppen vorliegen, die unter Chlorwasserstoffabspaltung in Glycidylethergruppen überführt werden können. Während bei den BADGE basierenden Epoxidharzen zunächst die Epoxidierung und erst im Folgenden die Oligomerisierung erfolgt, liegt bei den NOGE-Harzen zum Zeitpunkt der Epoxidierung bereits ein oligomerisiertes Harz vor (Abb. 2.14).

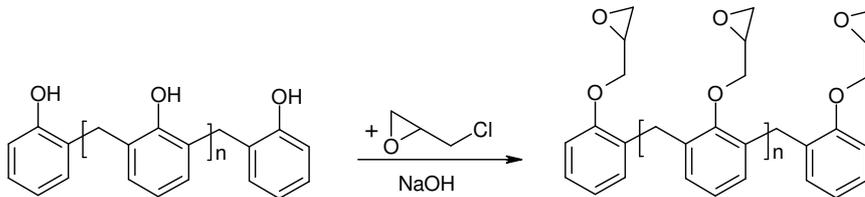


Abb. 2.14: Novolakglycidylether (NOGE)

Ähnlich wie bei den reinen Phenolharzen ergibt sich auch hier aufgrund der möglichen verschiedenen Phenol/Formaldehyd-Verhältnisse und der daraus resultierenden Kettenlänge, der Variation der Phenolkomponente und der verschiedenartigen Herstellungsweisen der Novolacke sowie dem Veretherungsgrad der phenolischen Hydroxylgruppen eine große Möglichkeit der Modifizierung der Harze und damit ihrer Eigenschaften.²⁶

Wie bereits oben erwähnt, werden epoxidierte aliphatische Alkohole vorwiegend als reaktive Verdünnungsmittel eingesetzt. Ihr Vorteil gegenüber inerten Verdünnungsmitteln, wie Toluol oder Xylol, ist der Einbau in das sich bildende dreidimensionale Netzwerk, so dass es zu keinem Schrumpfverlust infolge Verdampfung bei der Harzherstellung kommt. Monofunktionelle Reaktivverdünner haben dabei allerdings den Nachteil, dass sie die Funktionalität des Harzes und somit auch die Dichte des gehärteten Produktes verringern.²⁸ Des Weiteren sind einige Reaktivverdünner aufgrund ihrer relativ hohen Flüchtigkeit nicht geeignet für heißhärtende Harzsysteme. In der Regel erfolgte ein Zusatz an Reaktivverdünnern in einer Menge von 5 – 30 % bezüglich des Basischarzes und ist dabei meist ein Kompromiss zwischen dem Optimum an Verarbeitungviskosität und erwünschten Endeigenschaften.¹⁶ Einige monofunktionelle bzw.

polyfunktionelle aromatische als auch aliphatische Reaktivverdünner, die unter anderem in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Abb. 2.15 dargestellt.

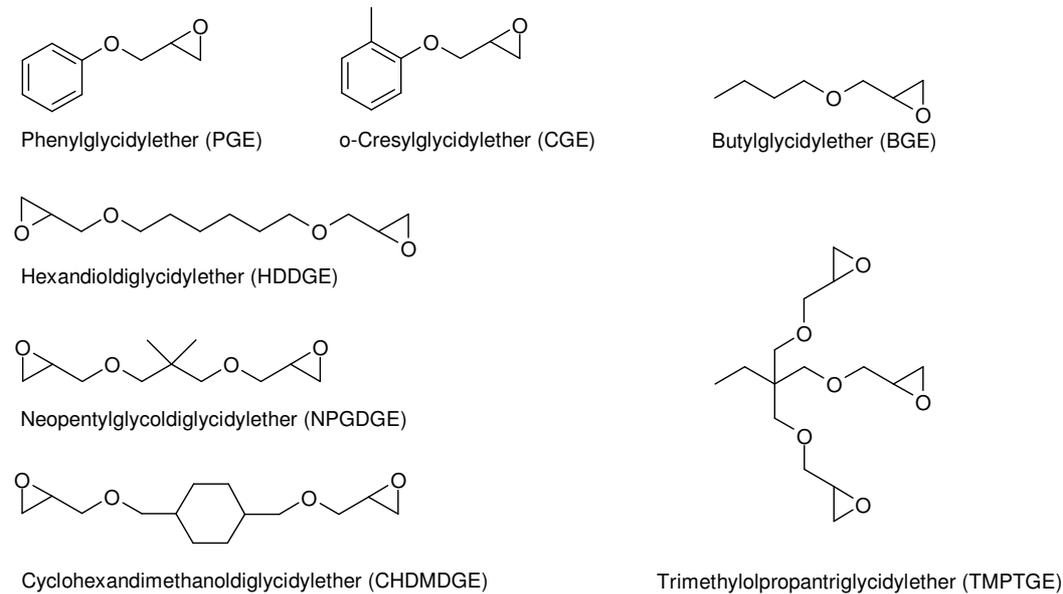


Abb. 2.15: verschiedene Reaktivverdünner

Epoxidharze als Additive (HCl-Fänger)

Epoxidharze werden häufig auch als Bestandteil von Organolsolen verwendet. Bei der Härtung dieser Polyvinylchlorid basierenden Polymerisate entsteht durch Dehydrochlorierung freie HCl, welche den Lack beschädigen kann. Ein wichtiges Additiv sind daher so genannte HCl-Fänger. Die Oxirangruppen der Epoxidharze übernehmen diese Funktion, in dem sie mit der HCl zu Hydroxychlorverbindungen reagieren (Abb. 2.16).

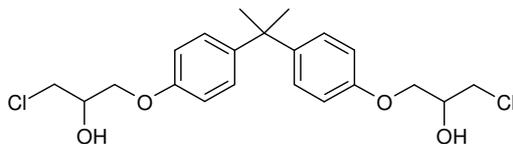


Abb. 2.16: BADGE·2HCl

2.1.3 Vernetzung in Harzsystemen

Eine alleinige Verwendung von Phenolharzen oder Epoxidharzen ist nicht üblich. Erst verschiedene Hilfsstoffe und Kombinationen von Harzen optimieren ein Harzsystem und verleihen diesem entsprechende anwendungsorientierte Eigenschaften. Füllstoffe, wie z.B. Kalk, Tonerde, Quarz oder Metallpulver und Metalloxide werden dabei vor allem zur Beeinflussung der Verarbeitungseigenschaften und zur Senkung der Harzkosten eingesetzt.²⁶ Pigmente (z. B. Titandioxid, Ruß oder Zinkphosphat) haben farbgebende und/oder korrosionsschützende

Funktionen, dagegen besitzen Additive (z. B. Mattierungsmittel oder Konservierungsmittel) spezielle chemische oder technologische Wirkungen.²⁹ Verdünnungsmittel dienen der Regulation der Viskosität und erst durch den Einsatz von polyfunktionellen Härtern und Vernetzern entsteht ein dreidimensionales Netzwerk.

Phenolharze werden häufig als Vernetzer für Epoxid- und Polyesterharze eingesetzt. Dadurch kommt es unter anderem zur Kombination der Eigenschaften der Einzelharze, woraus sich die Möglichkeit ergibt, Harze für spezielle Anwendungen zu optimieren.

Die positiven Eigenschaften der Phenolharze (hohe mechanische Belastbarkeit, Härte und gute Resistenz gegen Säure) werden so z. B. mit den Vorteilen der Epoxidharze (hohe Alkaliresistenz, Flexibilität, minimaler Volumenverlust bei der Härtung) verbunden.³⁰

Die Vernetzung von Epoxidharzen mit Phenolresolen kann durch die Reaktion unterschiedlicher reaktiver Gruppen der beiden Komponenten erfolgen. Neben der Bildung von möglichen intramolekularen Brückenbindungen, die lediglich zu Homokondensaten führen, erfolgt die Reaktion und damit auch die Vernetzung zwischen den methyloischen sowie phenolischen Hydroxylgruppen des Phenolresols und den Oxiranringen sowie sekundären OH-Gruppen des Epoxidharzes (Abb. 2.17).³¹

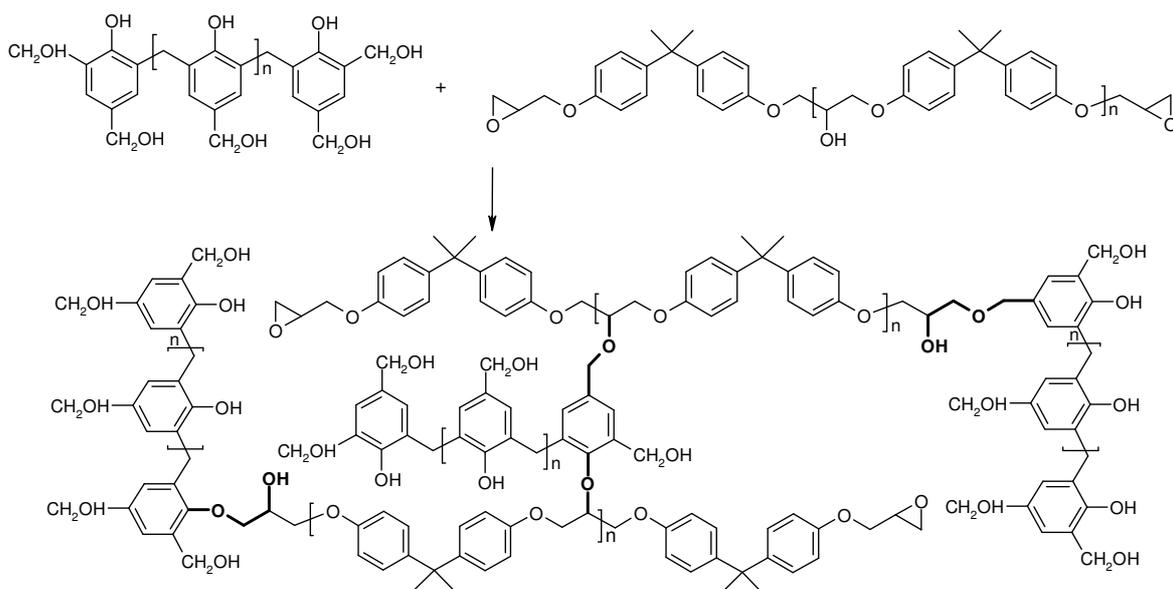


Abb. 2.17: mögliche Reaktionen zwischen funktionellen Gruppen von Resolen und Epoxiden bei der Vernetzung

Bei der Härtung hoch molekularer BADGE-basierender Harze mit Phenolresolen, erfolgt die Vernetzung hauptsächlich über Polykondensation durch Bildung von Etherbindungen zwischen den Methylogruppen des Resols und den sekundären OH-Gruppen des Epoxidharzes.²⁸ Für die

²⁹ Brock, T.; Groteklaes, M.; Mischke, P., Lehrbuch der Lacktechnologie, Hrsg. von Zorll, U., 2., berichtigte Auflage, Hannover: Vincentz, 1998.

³⁰ Gualpa, M.C.; Riccardi, C.C.; Vázquez, A., Study of the kinetic and crosslinking reaction of novolac with epoxy resin, Polymer 1998, Vol. 39, No. 11, 2247 - 2253.

³¹ Motawie, A.M.; Sadek, E.M., Adhesives and Coatings Based on Phenolic/Epoxy Resins, Polym Adv Technol 1999, Vol. 10, 223 - 228.

Vernetzung schwerer zugänglich sind die veretherten methyloischen Hydroxylgruppen der Phenolharze, diese werden erst bei hohen Temperaturen nach Spaltung der Etherbrücke wieder reaktionsfähig.

Die Reaktionsmöglichkeiten bei der Härtung von Epoxidharzen mit Novolaken sind aufgrund der fehlenden Methylogruppen etwas eingeschränkter. Die Vernetzung mit den, unter Säurekatalyse hergestellten, Novolaken verläuft intermolekular als Polyaddition, wobei bevorzugt die Epoxidgruppen mit den phenolischen OH-Gruppen des Phenolharzes reagieren. In gleicher Weise können jedoch, bei entsprechend hohen Konzentrationen, auch die sich durch die Oxiranringöffnung bildenden, sekundären OH-Gruppen mit den Epoxidgruppen reagieren. Beide Reaktionen stehen dann aufgrund nahezu gleicher Reaktivität bei der Vernetzung beider Harze in Konkurrenz.³² Ebenso beeinflusst der Einsatz von Katalysatoren die Reaktivität der einzelnen funktionellen Gruppen, wodurch Einfluss auf die Vernetzung und somit auf die Dichte des gehärteten Produktes genommen werden kann.^{33, 34}

Bei den Polyestern, die durch Polykondensation aus mehrwertigen Alkoholen und mehrbasischen Carbonsäuren entstehen, ist vor allem bei den gesättigten Verbindungen, die selbst keine polymerisierbaren Doppelbindungen enthalten, der Einsatz von Vernetzern notwendig. Die Vernetzung von Polyestern mit Phenolharzen erfolgt über die Veresterung der phenolischen und methyloischen Hydroxylgruppen mit den Carboxylgruppen (Abb. 2.18). In der folgenden Abbildung wurde als Beispiel für ein typisches Polyesterharz Polyethylenterephthalat (Terephthalsäure + Ethylenglycol) zur Vernetzung eines Phenolharzes verwendet.

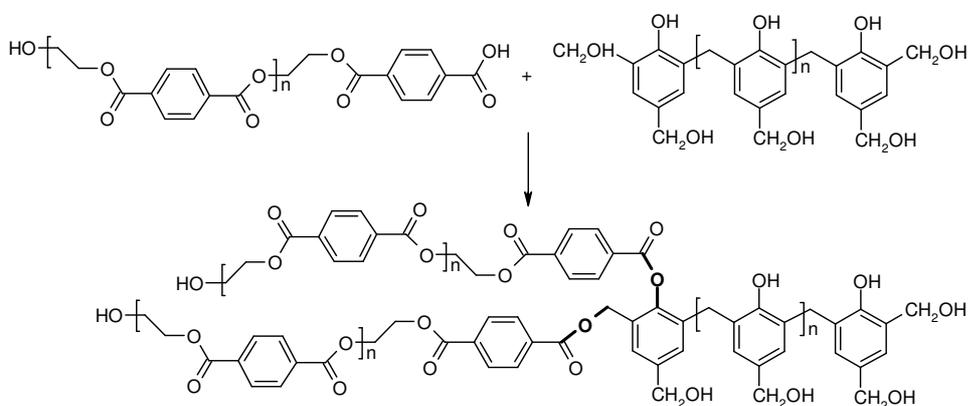


Abb. 2.18: mögliche Reaktionen zwischen funktionellen Gruppen von Resolen und Polyester bei der Vernetzung

Ebenso können jedoch auch Epoxidharze Vernetzungspartner für niedermolekulare carboxy-funktionalisierte Polyesterharze sein (Abb. 2.19).

³² Smith, M.E.; Ishida, H., Kinetics of the Condensation Reaction of Epoxide with Phenol: Linear Chain Growth versus Branching, *Macromolecules* 1994, Vol. 27, 2701 - 2707.

³³ Shechter, L.; Wynstra, J., Glycidyl Ether Reaction with Alcohols, Phenols, Carboxy Acids, and Acid Anhydrides, *Ind Eng Chem* 1956, Vol. 48, No. 1, 86 - 93.

³⁴ Ogata, M.; Kinjo, N.; Kawata, T., Effects of Crosslinking on Physical Properties of Phenol-Formaldehyde Novolac Cured Epoxy Resin, *J Appl Polym Sci* 1993, Vol. 48, 583 - 601.

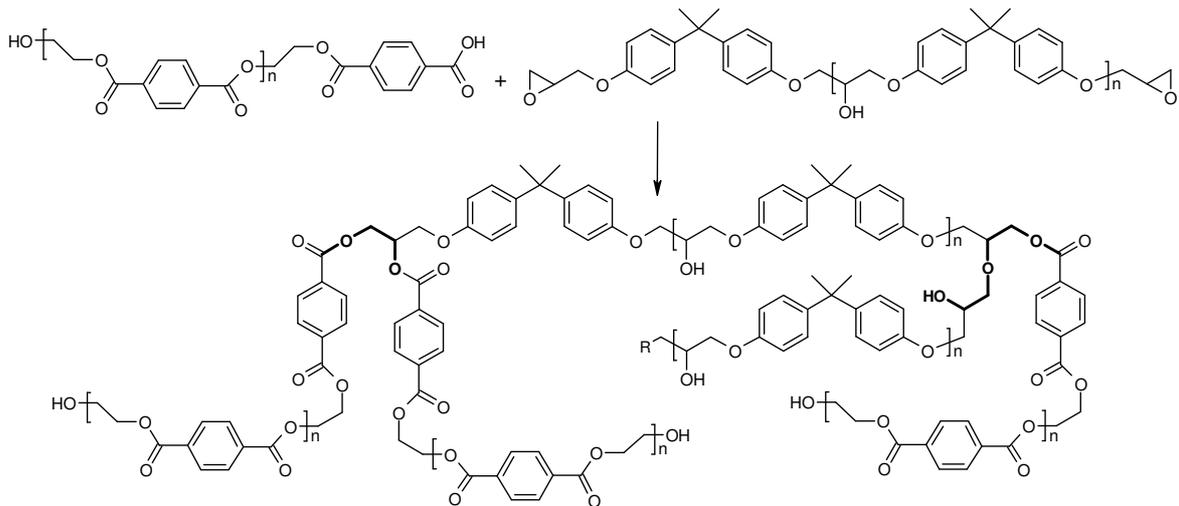


Abb. 2.19: mögliche Reaktionen zwischen funktionellen Gruppen von Polyestern und Epoxiden bei der Vernetzung

Vorherrschend ist hierbei die Reaktion zwischen den Epoxidgruppen und den Carboxylgruppen. Die dabei gebildeten sekundären Hydroxylgruppen können anschließend mit einem zweiten Mol Carbonsäure verestern, aber auch intramolekular mit einer Epoxidgruppe reagieren.²⁵

2.1.4 Industrielle Einsatzgebiete

Der Anteil der in Westeuropa hergestellten Phenol- und Epoxidharze an der Gesamtproduktion hochvernetzter, vollsynthetischer Kunstharze beträgt etwa 20 % (Abb. 2.20).¹³

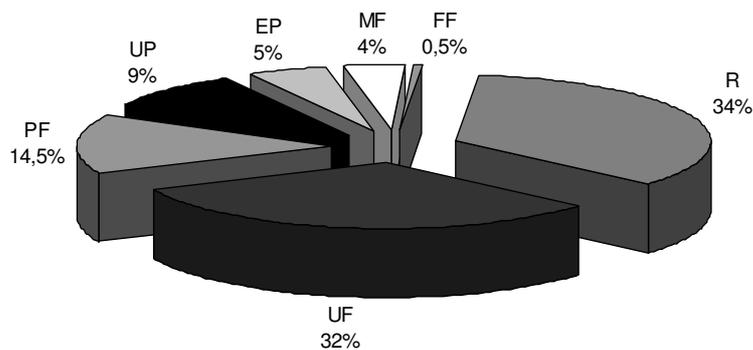


Abb. 2.20: Anteile der Kunstharze an der Produktion Westeuropas, R...Polyurethan-, Acryl- und Siliconharze, UH...Harnstoffharze, PH...Phenolharze, UP...ungesättigte Polyesterharze, EP...Epoxidharze, MH...Melaminharze, FH...Furanharze

Aufgrund der Vielfältigkeit der Phenolharze besitzen diese gegenüber den anderen Harzen den größten Anwendungsbereich. Von der gesamten Phenolharzproduktion werden etwa 65 % als Bindemittel in der Holzindustrie sowohl bei der Herstellung von Formmassen als auch für organische oder anorganische Dämmstoffe verwendet.⁹ Im Bereich der Verpackungsindustrie als Beschichtungen von Konservendosen haben die Kombinationen aus Phenolharzen und hochmolekularen Epoxidharzen („Goldlacke“) oder speziellen Polyesterharzen die Funktion einer

Barrierschicht. Sie schützt einerseits das Weißblech vor Korrosion und andererseits das enthaltene Lebensmittel vor der Anreicherung von Metallionen. Voraussetzung dabei ist, dass sie selbst keine gesetzlich vorgeschriebenen Mengen an Substanzen an das Lebensmittel abgeben oder dessen organoleptischen Eigenschaften und somit seine Art, Zusammensetzung und Qualität verändern. Verarbeitungstechnisch müssen sie sehr flexibel sein, geeignet für Tiefziehverfahren und resistent bei Sterilisationsprozessen.

Von den jährlich produzierten Mengen an Epoxidharzen werden mehr als 50 % im Bereich der Coating-Industrie verwendet. In der verarbeitenden Industrie zur Herstellung von Can Coatings finden davon 8 % Verwendung.²⁵

Ein weiterer großer Anwendungsbereich ist das Baugewerbe. Dabei sind vor allem die handwerklichen Bereiche zu nennen, die Epoxidharze bevorzugt in Form von Klebstoffen, Fugen- und Mörtelmasse, Grundierungen sowie Fußbodenbeschichtungen verwenden. Aber auch für den Einsatz im privaten Haushalt sind Epoxidharzsysteme erhältlich. Diese bestehen meist aus Harz und Reaktivverdünner und werden in Form von so genannten Zwei-Komponenten-Klebern in den Handel gebracht. Vor der Verwendung müssen beide nur noch miteinander vermischt werden.

2.2 Toxikologische Tests und physiologische Reaktionen

2.2.1 Zytotoxizitätstest

Die Zelle als kleinster Bestandteil von lebenden Organismen spielt im Rahmen von toxikologischen Untersuchungen eine wichtige Rolle. Xenobiotika gelangen prinzipiell über die Zellmembranen in den Organismus, wo anschließend in den Zellen unterschiedliche Organellen für ihre Speicherung, Metabolisierung und Ausscheidung verantwortlich sind. Alle toxikologisch begründeten Symptome haben somit ihre Ursache auf zellulärer Ebene.³⁵

Die Zytotoxizität von Substanzen kann sich durch unterschiedlichste Funktionsstörungen der Zellen äußern. Die nicht zwingend zum Tod führenden Veränderungen der Plasmamembranen, der Membranen von Zellorganellen oder sonstige für die Zellen lebenswichtige Vorgänge werden dabei als Endpunkte für Zelltests und somit zur Bestimmung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen genutzt.³⁶

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden zwei verschiedene humane Krebszelllinien verwendet. Die Zelllinie Hep-G2 wurde 1975 aus einem Lebertumor eines 15-jährigen argentinischen Jungen etabliert.³⁷ Durch die Produktion verschiedener Plasmaproteine und vorhandener metabolischer Aktivität repräsentieren sie den Metabolismus von normalen

³⁵ Eisenbrand, G.; Metzler, M., Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner - Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren, Korrigierter Nachdruck, 1. Auflage 1994, Stuttgart, New York, Thieme Verlag 2001.

³⁶ Lindl, T., Zell- und Gewebekultur - Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen; 5., überarb. und erw. Aufl., Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl. 2002.

³⁷ Aden, D.P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B.B., Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, Nature 1979, Vol. 282, 615 - 616.

humanen Leberzellen sehr gut.³⁸ Bei den zweiten verwendeten Zellen handelt es sich um die 1964 aus einem Darmtumor einer 44jährigen Frau etablierten HT-29 Zelllinie.³⁹

Zur Detektion des toxikologischen Potentials verschiedener Phenole wurde der Neutralrottest, dessen Endpunkt über Veränderungen der lysosomalen Membran bestimmt wird, genutzt. Die Verwendung des Vitalfarbstoffes Neutralrot wurde erstmals von Borenfreund und Puerner⁴⁰ beschrieben (Abb. 2.21). Danach werden die Zellen zunächst in dem zu untersuchenden Agens inkubiert und anschließend mit dem schwach kationischen Farbstoff behandelt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, werden verschiedene Konzentrationen der Unter-

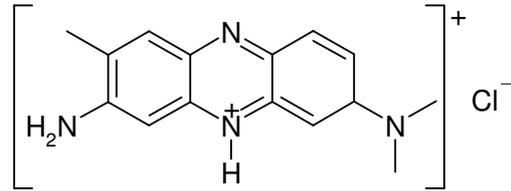


Abb. 2.21: Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-phenazinium chlorid, C.I. 50040)

suchungssubstanzen verwendet. Bei nicht geschädigten Zellen erfolgt eine Diffusion des Färbemittels durch die Membranen mit anschließender Anreicherung in den Lysosomen. Bezüglich der Akkumulation des Farbstoffes in den Lysosomen bestehen zwei verschiedene Theorien. Zum einen wird angenommen, dass sich die Neutralrot-Moleküle intrazellulär an anionische Stellen, wie Carboxyl- oder Phosphatgruppen der Lysosomenmembran binden.⁴¹ Andererseits gibt es die Hypothese, dass es aufgrund des pH-Gradienten zwischen dem Cytosol (pH 7,3) und dem lysosomalen Lumen (pH 5,0) zu einer Ionisierung des bei pH 7,4 ungeladenen Farbstoffes im saueren Milieu der Lysosomen kommt. Der Farbstoff wird durch die Änderung seiner elektrischen Ladung in eine membranundurchlässige Form umgewandelt, wodurch es zur Anreicherung kommt. Die Lysosomen fungieren somit als Ionenfalle.⁴² Im Allgemeinen bewirkt die pH-Wertänderung den Farbumschlag des Neutralrot-Farbstoffes, dessen Umschlagsintervall von rot zu gelb bei einem pH von 6,8 - 8 angegeben wird.⁴³

Durch Schädigungen an Zell- oder Lysosomenmembran bzw. beim Tod der Zellen durch zytotoxisch wirksame Substanzen vermindert sich die Aufnahme des Farbstoffes bzw. findet gar nicht statt. Bei anschließenden Waschschritten, nach der Expositionszeit mit dem Neutralrotfärbereagenz wird er somit intrazellulär nicht zurückgehalten. Dem zufolge besteht eine Proportionalität zwischen der Menge an aufgenommenen Farbstoff und der Anzahl an vitalen Zellen. Die Auswertung erfolgt nach Extraktion des zellulär gebundenen Farbstoffes und dessen photometrischer Messung bei 540 nm im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Über Dosis-Wirkungskurven können für die Testagenzien IC₅₀-Werte bestimmt werden.

³⁸ Babisch, H.; Sardana, M.K.; Borenfreund, E., Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined *in vitro* with the human liver tumor cell line, HepG2, Cell Biol Toxicol 1988, Vol. 4, No. 3, 295 - 309.

³⁹ Fogh, J.; Trempe, G., New Human Tumor Cell Lines, in Human Tumor Cell in Vitro, ed. Fogh, J., Plenum Press, 115 - 159, New York 1975.

⁴⁰ Borenfreund, E.; Puerner, J.A., Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, Toxicol Lett 1985, Vol. 24, 119 - 124.

⁴¹ Borenfreund, E.; Babich, H., *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide, and organotin salts to neutral cell and fibroblasts, Cell Biol and Toxicol 1987, Vol. 3, No. 1, 63 - 73.

⁴² Lemieux, B.; Percival, M.D.; Falqueyret, J.P., Quantitation of the lysosomotropic character of cationic amphiphilic drugs using the fluorescent basic amine Red DND-99, Anal Biochem 2004, Vol. 327, 247 - 251.

⁴³ Rauscher, K.; Voigt, J.; Wilke, I.; Wilke, K.-Th., Chemische Tabellen und Rechen tafeln für die analytische Praxis, 8. stark überarbeitete Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1986.

2.2.2 Fischembryotest

Schon seit einiger Zeit bestand das Bestreben den akuten Fischtest mit der Golddorfe (DIN 38412 L31) durch eine alternative Bestimmungsmethode sowohl in der routinemäßigen Abwasserüberprüfung als auch bei der Bewertung von Chemikalien zu ersetzen.⁴⁴ In diesem Zusammenhang bewiesen mehrere Arbeitsgruppen, dass der Fischeitest im Vergleich zum Fischtest, aber auch gegenüber anderen Biotest, genauso sensitiv oder sogar empfindlicher ist, womit er die Ansprüche an eine Alternativmethode erfüllt.^{45, 46}

Seit 01.01.2005 ist die Durchführung des Fischeitestes nach DIN 38415-T6 nun Bestandteil des Abwasserabgabegesetzes und ersetzt den akuten Fischtest bei der Untersuchung der Fischgiftigkeit von Abwässern.^{47, 48} Als Testmaterial werden die Eier des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio*) verwendet. Da innerhalb der Versuchszeit von 48 h das Nervensystem des Fischembryos noch nicht vollständig ausgeprägt ist, wird ihnen ein Schmerzempfinden abgesprochen, so dass dieser ökotoxikologische Test nicht als Tierversuch sondern als „suborganismischer“ Test eingestuft wurde.

Durch die leichte Hälterung und die ganzjährige Produktion transparenter, nicht klebender Eier ist der Zebraäbrbling besonders als Testorganismus für toxikologische Untersuchungen geeignet. Um Aussagen über die Wirkung von Substanzen bzw. Substanzgemischen zu ermöglichen werden die befruchteten Eier in unterschiedlichen Verdünnungen der Schadstoffe oder Umweltproben exponiert. Nach Ablauf der Testdauer von 48 h wird ihre Entwicklung mit denen der Kontrolle verglichen. Gemäß DIN-Methode ist ein Embryo nach 48 h als tot anzusehen, wenn er koaguliert ist, der Herzschlag nicht feststellbar ist, die Ablösung des Schwanzes vom Dottersack nicht erfolgte oder die Somiten nicht angelegt sind. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Embryonen mit derartigen Fehlentwicklungen nicht schlüpfen.⁴⁷ Effekte auf subletaler Ebene werden in der DIN-Methode nicht berücksichtigt. Von vielen Arbeitsgruppen werden jedoch auch diese Effekte beschrieben, wodurch vielfach wesentlich differenziertere Aussagen über die Wirkung der Proben erhalten werden, da das gesamte Wirkungsspektrum von Schadstoffen oder Umweltproben erfasst wird. Als nicht letale Missbildungen werden das Fehlen der Augenanlagen, fehlende Spontanbewegung, das Fehlen der Pigmentierung, Ödeme, Wirbelsäulenverkrümmungen sowie allgemeine Deformationen beschrieben (Abb. 2.22).⁴⁹

⁴⁴ DIN 38412 Teil 31, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Testverfahren mit Wasserorganismen, (Gruppe L), Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Fischen über Verdünnungsstufen (L31), DIN Deutsches Institut für Normung e.V. März 1989, Beuth Verlag, Berlin.

⁴⁵ Friccius, T.; Schulte, C.; Ensenbach, U.; Seel, P.; Nagel, R., An Embryo Test Using the Zebrafish – a new Possibility of Testing and Evaluating the Toxicity of Industrial Waste Waters, *Vom Wasser* 1995, Vol. 84, 407 - 418

⁴⁶ Braunbeck, T.; Lammer, E., Background paper on Fishembryo Toxicity Assays, Umwelt Bundesamt, UBA-Contract Number 203 85 422, 6. März 2006.

⁴⁷ DIN-Norm 38415-6-T6, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), Teil 6 Giftigkeit gegenüber Fischen, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T6), DIN Deutsches Institut für Normung e.V. August 2003, Beuth Verlag, Berlin.

⁴⁸ Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004 Teil I Nr. 67, ausgegeben zu Bonn am 15.12.2004; Fünftes Gesetz zur Änderung des Abwasserabgabegesetzes vom 09.12.04

⁴⁹ Vobach, M.; Kammann, U., *Fisch und Umwelt, Der Fischei-Test - Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen*, Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch 2003, Vol. 50, Nr. 3, 126 - 130

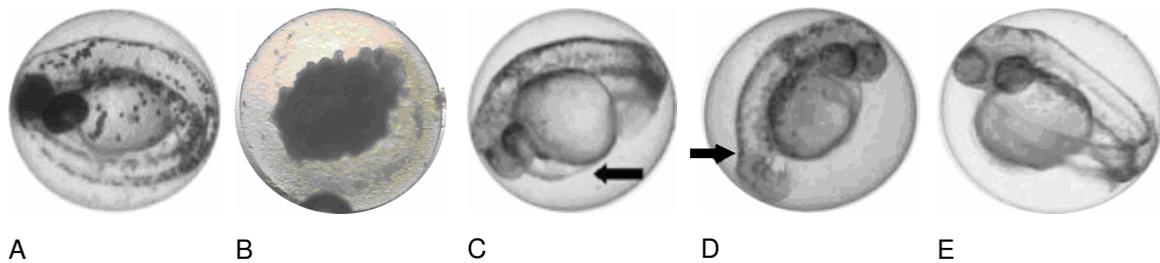


Abb. 2.22: Zebrafischembryo (48h): A...normal entwickelt, B...koaguliertes Ei (letal) C... Dottersacködem, D...Wirbelsäulen-deformation, E...keine Pigmentierung⁵⁰

Die erste Zellteilung vollzieht sich bereits etwa 35 min nach der Befruchtung. Wichtig bei der Versuchsdurchführung ist daher eine frühzeitige Exposition der befruchteten Eier mit dem Untersuchungsmaterial, da viele Fehlentwicklungen von schädlichen Einflüssen in einer frühen sensiblen Entwicklungsphase abhängig sind.⁵¹ So konnten deutliche Zusammenhänge zwischen dem Alter der Eier zum Zeitpunkt der Exposition und der Mortalitätsrate nach 24 und 48 h beobachtet werden. Je älter die Eier waren desto niedriger war die Mortalitätsrate. Die Überführung der Eier in die Testlösung sollte daher innerhalb einer Stunde nach der Befruchtung erfolgen. Die Eier befinden sich dann zum Testbeginn etwa im 4- bis 8-Zellstadium.⁴⁶

Nach 12 h sind Kopfanlagen und Schwanzknospen erkennbar. Zwei Stunden später werden die Anlagen der Augen und die ersten Somitenpaare, aus denen sich im weiteren Verlauf vorwiegend Wirbel und Muskulatur entwickeln, sichtbar. Die Ablösung des Schwanzes vom Dotter ist 24 h nach der Befruchtung beendet und der Embryo bewegt sich. Nach 36 Stunden sind erste Pigmentierungen und der Blutkreislauf anhand der Bewegung der Blutzellen zu beobachten. Mit zunehmendem Entwicklungsalter steigt die Herzfrequenz, nach 48 h ist der Herzschlag regelmäßig. Unter natürlichen Bedingungen schlüpfen die Embryonen nach etwa 4 Tagen.^{52, 53}

Zur Bewertung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ist die Kenntnis um verschiedene methodische Aspekte, welche nicht unerheblichen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben können, von Bedeutung. So können Substanzen, vor allem Salze, allein durch osmotische Wirkung Schädigungen an den Embryonen bewirken.⁵⁴ Von Lange et al.⁵⁵ wird der zulässige Höchstwert, bis zu dem osmotische Effekte ausgeschlossen werden, mit 100 mOsmol/l angegeben. Des Weiteren sollte die Konzentration der zu untersuchenden Probe über die gesamte Versuchsdauer konstant bleiben. Die Anwendung des Fischebryotests mit statischer Exposition ist somit bei sehr instabilen Verbindungen oder Substanzen mit einem hohen Dampfdruck limitiert. Für diese Proben

⁵⁰ Vobach, M.; Kammann, U., Fischeitest - ein fischspezifisches Testsystem, Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Jahresbericht 2002, S. 67

⁵¹ Sander, K.; Baumann, M., Auslösung von embryonalen Fehlbildungen beim Zebraäbrbling, Biol Unserer Zeit 1983, Vol. 13, Nr. 3, 87 - 94

⁵² Bachmann, J., Entwicklung eines Teratogenitäts-Screening-Tests mit Embryonen des Zebraäbrblings *Danio rerio*, Dissertation 2002, TU-Dresden

⁵³ Nagel, R., *DaT*: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology, *Altex* 2002, Vol. 19, No. 1, 38 - 48.

⁵⁴ Lange, M., Vergleich von Embryotest und Zellkultur als mögliche Alternativen zum akuten Fischtest, Diplomarbeit 1993. Johannes Gutenberg-Universität Mainz

⁵⁵ Lange, M.; Gebauer, W.; Markl, J.; Nagel, R., Comparison of testing acute toxicity of zebrafish *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternative to the acute fish test, *Chemosphere* 1995, Vol. 30, No. 11, 2087 - 2102

sind semi-statische Testsysteme oder Durchfluss-Verfahren zu verwenden.⁵⁶ Die Größe und Ladung der Moleküle der Testsubstanz sind ebenfalls Faktoren die bezüglich der Bioverfügbarkeit eine Rolle spielen. Sie müssen in der Lage sein sowohl die Membranen als auch die den Embryo umgebende Fruchthülle (Chorion) zu passieren. Braunbeck et al.⁵⁷ beschrieb eine zunehmende Barrierefunktion des Chorions mit steigender Lipophilie der Schadstoffe. Für verschiedene Phenole konnte die Diffusion durch das Chorion bis zum Embryo gezeigt werden.⁵⁸ Bei geringer Wasserlöslichkeit der Testsubstanzen erfolgt meist der Einsatz von Lösungsvermittlern, wobei in der Regel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet wird. Dabei ist eine mögliche Veränderung der Membrandurchlässigkeit und somit eine Beeinträchtigung des Stoff- und Mineralhaushaltes zu beachten.⁵⁹ Um die Verteilung der Testsubstanzen und deren Konzentration während des Tests zu überprüfen, wäre die Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen möglich. Bezüglich des Sauerstoffbedarfs können sich die Embryonen einem weiten Bereich von Sauerstoffkonzentrationen anpassen. So konnte Braunbeck et al.⁵⁷ zeigen, dass selbst bei einem Sauerstoffgehalt von 2 mg/l keine Fehlentwicklungen auftreten.

Nach Beendigung des Tests kann mittels Dosis-Wirkungs-Kurven ein EC_{50} -Wert als toxikologische Kenngröße analog des Neutralrot-Tests für jede untersuchte Probe ermittelt werden. Der EC_{50} -Wert ist dabei die Konzentration, bei der 50 % der Embryonen im Vergleich zur Kontrolle nach einer bestimmten Versuchsdauer einen Effekt zeigen.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse lassen sich z. T. Rückschlüsse auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationships) ziehen. So werden Zusammenhänge zwischen dem Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW}$), der Wasserlöslichkeit aber auch der Acitität (pK_s) und dem toxikologischen Potential einer Substanz beschrieben. Ziel solcher Struktur-Wirkungs-Modelle ist, innerhalb von speziellen Substanzklassen anhand von physikochemischen Eigenschaften für einzelne Chemikalien deren Wirkung im biologischen System vorherzusagen.

In der Regel wird dabei von einer narkotischen Wirkung der Substanzen, d.h. von einer unspezifischen Störung der Membranstruktur durch die Verbindungen, ausgegangen. Der toxische Effekt ist dabei allein von der Konzentration der in der Membran vorhandenen Stoffe abhängig. Die spezifischen Eigenschaften der Verbindungen spielen nur in Bezug auf ihre Lipophilie eine Rolle, da diese das Vermögen Membranen zu durchdringen bestimmt. Spezifische Eingriffe in den Metabolismus der Organismen wie z. B. die Beeinflussung von Protonengradienten (Entkopplung) oder die Hemmung des Elektronentransportes durch die Besetzung von speziellen Bindungsstellen sind meist substanzspezifisch und somit ungeeignet, um allgemeine Zusammenhänge von Substanzklassen aufzuzeigen.

⁵⁶ OECD Guideline for Testing of Chemicals, Guideline 203, Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

⁵⁷ Braunbeck, T.; Böttcher, M.; Hollert, H.; Kosmehl, T.; Lammer, E.; Leist, E.; Rudolf, M.; Seitz, N., Towards an Alternative for the Acute Fish LC_{50} Test in Chemical Assessment, The Fish Embryo Toxicity Test Goes Multi-species - an Update, Alltex 2005, Vol. 22, 87 - 102.

⁵⁸ Ensenbach, U., Kinetik, Akute Toxizität und Verteilung von Umweltchemikalien beim Ei des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio*). Diplomarbeit 1987, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

⁵⁹ Maiwald, S., Wirkung von Lösungsvermittlern und lipophilen Substanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*). Diplomarbeit 1997, Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden.

Nach Könemann⁶⁰ ist die Lipophilie einer Substanz ausgedrückt über den $\log K_{OW}$ die beste Möglichkeit entsprechende Prognosen zu treffen. Er erstellte ein entsprechendes Modell basierend auf LC_{50} -Werten von 50 Industriechemikalien (u. a. Chlorbenzole, Alkohole, Alkylhalogenide) im Fischtest mit Guppies (*Poecilia reticulata*) und deren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (Abb. 2.23).

Der $\log 1/LC_{50}$ ist dabei direktproportional zum Logarithmus des K_{OW} -Wertes. Der Korrelationskoeffizient von 0,988 bekräftigt die Linearität der Anpassung.

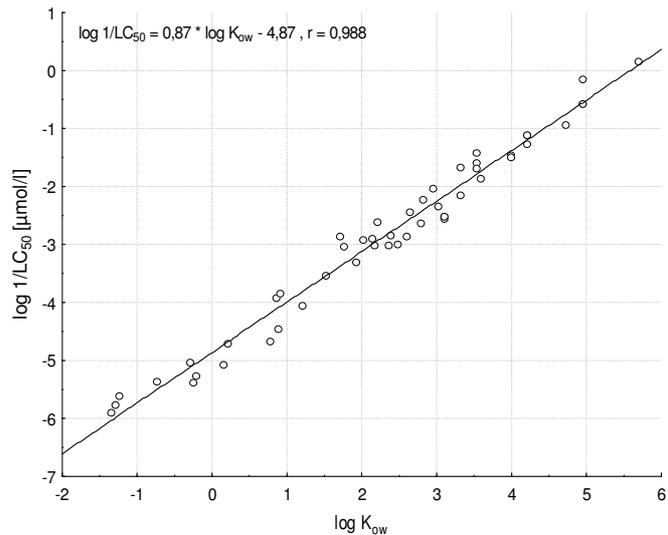


Abb. 2.23: Struktur-Wirkungs-Modell nach Könemann⁶⁰

Zum gleichen Ergebnis kamen Van Leeuwen et al.⁶¹. Sie korrelierten die $\log K_{OW}$ - Werte von 27 narkotisch wirkenden Verbindungen mit deren NOEC-Werten (no-observed-effect-concentration), welche im Fischtest mit der Goldelritze (*Pimephales promelas*) und dem Zebraabrbilling (*Brachydanio rerio*) ermittelt wurden. Die Gleichung zur Ermittlung von quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde von Van Leeuwen et al.⁶¹ zu $\log NOEC = -0,87 + \log K_{OW} - 2,35$ bestimmt. Der unterschiedliche Achsenabschnitt ergibt sich dabei aus der Verwendung der NOEC - Werte gegenüber den LC_{50} - Werten.

Für sehr lipophile Substanzen mit einem $\log K_{OW} > 6$ wird z. T. eine Abweichung von der linearen Korrelation des Modells, zu niedrigeren Werten als es nach dem $\log K_{OW}$ zu erwarten wäre, beobachtet. Bei der Korrelation von Bioakkumulation und $\log K_{OW}$ wird dies vor allem auf eine reduzierte Permeation durch die Doppellipidschicht der Membranen aufgrund der Molekülgröße und -struktur sowie der Lipophilie aber auch auf einen möglicherweise sehr schnellen Metabolismus und somit Elimination der Stoffe zurückgeführt. Des Weiteren ist auch der Verlust des Modellcharakters des K_{OW} -Wertes für die Löslichkeit in den Phospholipidmembranen für entsprechend hydrophobe, hochmolekulare Verbindungen möglich.⁶²

2.2.3 physiologische Reaktionen bei oraler Aufnahme

Das toxikologische Potential von Epoxidverbindungen, welches auf die hohe Reaktivität des Oxiranringes gegenüber Nucleophilen zurückgeführt wird, wurde vor allem anhand des Monomers

⁶⁰ Könemann, H., Quantitative Structure-Activity relationships in fish toxicity studies – Part I: relationships for 50 industrial pollutants, *Toxicology* 1981, Vol. 19, 209 - 221.

⁶¹ Van Leeuwen, C.J.; Van der Zandt, P.T.J, Application of QSARs, Extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants, *Environ Toxicol and Chem* 1992, Vol. 11, 267 - 282.

⁶² Fent, K., Ökotoxikologie - Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie, 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, New York, Thieme Verlag 2003

BADGE untersucht. Vanhoutte et al.⁶³ identifizierten *in vitro* BADGE-Addukte mit Nucleobasen humaner DNA. Steiner et al.⁶⁴ beschrieben die kovalente Bindung von BADGE an DNA *in vivo* bei Mäusen und die daraus resultierende Bildung von Desoxyadeninaddukten. Dagegen beobachteten Climie et al.^{65, 66} eine sehr schnelle Metabolisierung und Ausscheidung bei oraler Gabe von ¹⁴C-BADGE *in vivo* bei Mäusen über die Fäzes und den Urin. Bereits 8 Tagen nach der oralen Gabe waren nur 0,1 % der verabreichten Dosis vom Tier nicht ausgeschieden. Als Hauptmetabolit wurde dabei das durch Hydratisierung der Epoxidringe gebildete Bisdiol bestimmt, welches weiter zu Carbonsäuren und anderen Abbauprodukten metabolisiert wird.

Nicht umgesetztes BADGE ist im Körper aufgrund effizienter Stoffwechselprozesse der Leber nach oraler Aufnahme kaum existent. BADGE kann einerseits direkt durch ein Monooxygenasesystem abgebaut werden, wodurch Glycidaldehyd entsteht, welches in der Lage ist an die DNA zu binden. In Konkurrenz dazu werden die Oxiranringe der Seitenketten durch eine Epoxidhydrilase zum korrespondierenden Bisdiol BADGE·2H₂O und seinen Konjugaten reduziert, welche anschließend durch Monooxygenasen umgesetzt werden können (Abb. 2.24).

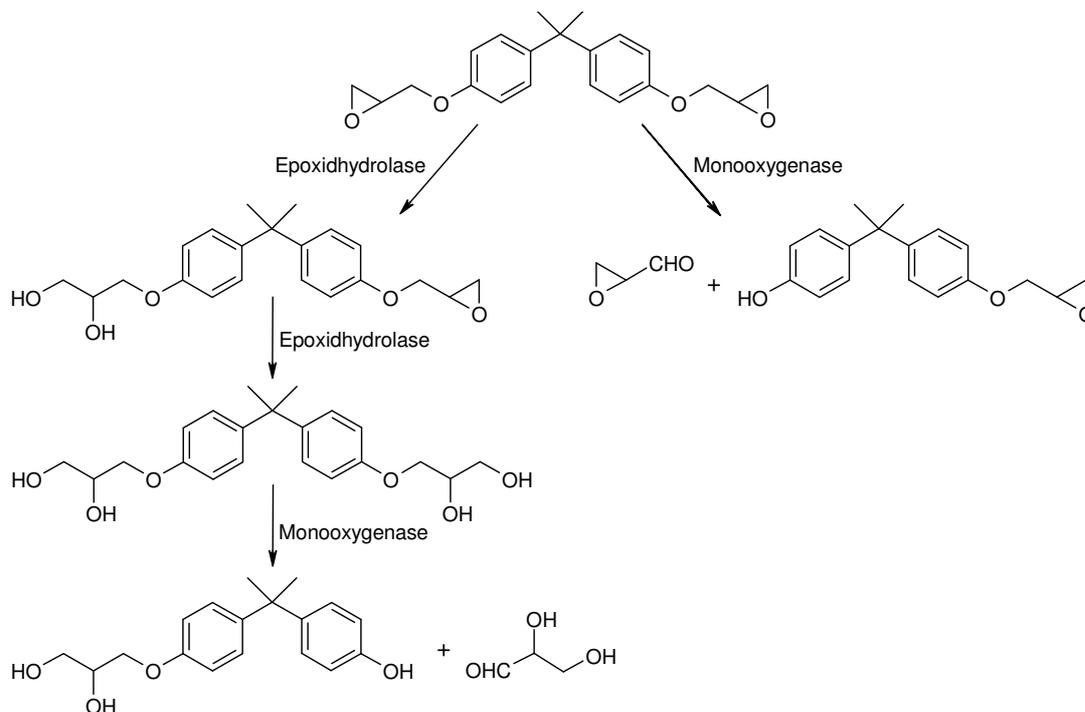


Abb. 2.24: konkurrierende Metabolismen von BADGE

⁶³ Vanhoutte, K.; Joos, P.; Lemièrre, F.; Van Dongen, W.; Esmans, E.L., Thermospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of the DNA Adducts Formed Between 2'-Desoxynucleosides and Bisphenol A Diglycidyl Ether, *J Mass Spectrom* 1995, Vol. 30, 1453 - 1461.

⁶⁴ Steiner, S.; Hönger, G.; Sagelsdorff, P., Molecular dosimetry of DNA adducts in C3H mice treated with bisphenol A diglycidylether, *Carcinogenesis* 1992, Vol.13, No. 6, 969 - 972.

⁶⁵ Climie, I.J.; Hutson, D.H.; Stoydin, G. Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4](2,3-epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of Bisphenol A (DGE BPA) in the mouse. Part I. A comparison of the fate of a single dermal application and of a single oral dose of ¹⁴C-DGE BPA, *Xenobiotica* 1981, Vol. 11, No. 6, 391 - 399.

⁶⁶ Climie, I.J.; Hutson, D.H.; Stoydin, G., Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4](2,3-epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of Bisphenol A (DGE BPA) in the mouse. Part II. Identification of metabolites in urine and feces following a single oral dose of ¹⁴C-DGE BPA, *Xenobiotica* 1981, Vol. 11, No. 6, 401 - 424.

Weder der dabei entstehende Alkohol noch das Glyceraldehyd sind in der Lage DNA-Addukte zu bilden. Bei geringen Dosen an BADGE ist der Metabolismus über die Epoxidhydrolase der Hauptabbauweg. Nur bei Sättigung oder Inhibierung des Enzyms können über die Produkte des Monooxygenasesystems Interaktionen mit der DNA erfolgen.⁶⁷

Neben der kaum vorhandenen akuten Toxizität von BADGE ist somit auch dessen chronisch toxisches Potential bei oraler Aufnahme im Gastrointestinaltrakt oder anderen Geweben als gering einzustufen. Auf Grundlage der oralen chronischen Toxizitäts- und Kanzerogenitätsstudien an Ratten wurde ein NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) von 15 mg/kg Körpergewicht und Tag festgelegt. Unter Berücksichtigung eines Unsicherheitsfaktors von 100 ergibt sich daraus ein TDI von 0,15 mg/kg Körpergewicht.⁶⁸

Die Entstehung der hydrochlorierten Metabolite $\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ und $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$ konnte bei der Inkubation von BADGE in einem Magensaftsimulanz beobachtet werden. Ihr Metabolismus mit möglicher Hydrolyse zu $\text{BADGE}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ist jedoch bisher nicht geklärt. $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$ wird stellvertretend für die Monochlorhydrinverbindungen als „worst case“-Substanz betrachtet. Ein *in vivo* Mikrokerntest an Mäusen ergab keine Hinweise auf ein genotoxisches Potential.⁶⁸ Im Amestest und im Mutagenitätstest an Säugetierzellen *in vitro* konnte keine mutagene Aktivität beobachtet werden. Negative Ergebnisse wurden ebenfalls im Test auf Chromosomenaberration erhalten.⁶⁹

Auch die Mutagenität von Bisphenol F-Diglycidylether (BFDGE) und Epoxy-Phenol-Novolak-Harzen (NOGE) wurde untersucht. Da NOGE-Harze jedoch mehr als zwei Epoxidgruppen pro Molekül enthalten können, ist BFDGE als Komponente mit dem geringsten Molekulargewicht nicht als „worst-case“-Testverbindung zur Evaluierung der Toxizität geeignet. Bei *in vivo* Mutagenitätsstudien mit einem handelsüblichen Epoxid-Novolak-Harz, welches ein geringes Molekulargewicht und einen hohen Anteil an Oligomeren mit einer Molaren Masse < 1000 Da aufwies, konnte bis zur empfohlenen Höchstmenge kein genotoxisches Potential beobachtet werden.⁷⁰

Bezüglich BPA gibt es ebenfalls keine Hinweise auf eine akute Toxizität. Bei Ratten wurde der LD_{50} bei oraler Aufnahme zu > 2 g/kg Körpergewicht bestimmt. Auch entsprechende Anhaltspunkte bezüglich krebserregender oder fruchtschädigender Eigenschaften sind nicht bekannt. Die östrogene Wirkung von BPA gilt dagegen als bewiesen. Kitamura et al.⁷¹ führten dies auf

⁶⁷ Bentley, P.; Bieri, F.; Kuster, H.; Muakkassah-Kelly, S.; Sagelsdorff, P.; Stäubli, W.; Waechter, F., Hydrolysis of bisphenol A diglycidylether by epoxide hydrolases in cytosolic and microsomal fractions of mouse liver and skin: inhibition by bis epoxypropylene glycol ether and the effects upon the covalent binding to mouse skin DNA, *Carcinogenesis* 1989, Vol.10, No. 2, 321 - 327.

⁶⁸ EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (ACF) on a request the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane bis(2,3-epoxypropyl)ether (Bisphenol A diglycidyl ether, BADGE) REF.No. 13510 and 39700, (EFSA-Q-2003-178), *The EFSA-Journal* 2004, Vo. 86, 1 - 40.

⁶⁹ SCF - Statement of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), Document SCF/CS/PM/GEN/13510/22112002 Final vom 9. Dezember 2002.

⁷⁰ EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (ACF) on a request the Commission related to Epoxy Phenolic Novolac Resin (NOGE), Question N° EFSA-Q-2004-158, *The EFSA-Journal* 2005, 274, 1 - 10.

⁷¹ Kitamura, S.; Suzuki, T.; Sanoh, S.; Kohta, R.; Jinno, N.; Sugiharra, K.; Yoshihara, S.; Fujimoto, N.; Watanabe, H.; Ohta, S., Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds, *Toxicol Sci* 2005, Vol. 84, 249 - 259.

Grundlage von Östrogenitätstests mit 20 verschiedenen Bisphenolen strukturell auf die Hydroxylgruppe an der 4. Position des Phenylrings und der Lipophilie im Bereich des Propans zurück.

Vor allem die Ergebnisse der in den letzten Jahren erstellten Studien zur Toxizität von BPA führten zur erneuter Diskussion und Risikobewertung.

Bei oraler Aufnahme wird BPA sehr schnell in den Mikrosomen der Leber in BPA-Glucuronid umgewandelt. Durch die Glucuronidierung verliert BPA seine östrogene Wirkung und wird über den Urin, mit einer Halbwertszeit von etwa 6 h ausgeschieden. Aufgrund dieser Ergebnisse und wesentlichen Unterschieden in der Toxikokinetik zwischen Mensch und Ratte wurde der 2002 vom SCF (Scientific Committee on Food) festgelegte temporäre TDI-Wert (Tolerable Daily Intake) von 0,01 mg/kg Körpergewicht von der EFSA (European Food Safety Authority) auf 0,05 mg/kg Körpergewicht erhöht.^{72,73} Für beide TDI-Werte ist ein NOAEL-Wert von 5 mg/kg Körpergewicht und Tag die Basis. Korrigiert wurde nur der Unsicherheitsfaktor zwischen beiden Werten. Dieser wurde aufgrund der verbesserten Datenlage zur Wirkung von BPA auf Fortpflanzung und Entwicklung von 500 auf 100 reduziert.

Das einfachste Novolak-Monomer BPF besitzt im Vergleich zu BPA eine um etwa 40 % geringere östrogene Wirkung. Bei höher molekularen Phenolen, wie 4,4-(1,4-Phenyldiisopropyl)bisphenol konnten Kitamura et al.⁷¹ erst bei einer über 1000fach höherer Konzentration eine östrogene Wirkung zu beobachten.

2.2.4 Physiologische Reaktionen bei dermalen Kontakt

Während die toxikologische Wirkung von BADGE und seinen Derivaten bei oraler Aufnahme erst in den letzten Jahren umfangreich untersucht wurde, ist die Ausbildung von Kontaktekzemen im Zusammenhang mit Epoxidverbindungen schon sehr lange bekannt. Bereits 1955 wurde von Savitt⁷⁴ das Auftreten von Kontaktdermatosen in Verbindung mit Epoxidharzen beschrieben. Bei der allergische Kontaktdermatitis handelt es sich um eine zellvermittelte Immunreaktion vom Spättyp (Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell). Bei dieser Form der Allergie setzt die Auslösung von klinischen Symptomen, wie Rötungen, Papeln, Bläschen oder Schuppen, eine Sensibilisierung mit einem Kontaktallergen (Hapten) voraus. Dabei werden die niedermolekularen in der Regel unter 400 Da großen potentiell sensibilisierenden Substanzen erst nach Durchdringen der Hornschicht und Bindung an Proteine der Epidermis zu vollständigen Allergenen (Hapten-Carrier-Komplexe).⁷⁵ Die Interaktion zwischen Hapten und Protein erfolgt dabei überwiegend über koordinative und kovalente Bindungen. Viele Chemikalien besitzen elektrophile Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen mit den in Aminosäuren und Proteinen zahlreich vorkommenden nucleophilen Gruppen, wie Amino-, Thiol- oder Hydroxylgruppen, zu reagieren. Dabei werden vier Hauptreaktionsmechanismen unterschieden: die elektrophile Addition oder nucleophile Substitution

⁷² SCF - Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A, Document SCF/CS/PM/3936 Final vom 3. May 2002.

⁷³ EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (ACF) on a request the Commission related to 2,2-Bis(4-Hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A), Question-N° EFSA-Q-2005-100, The EFSA-Journal 2006, 428, 1 - 75.

⁷⁴ Savitt, L.E., Kontakt dermatitis encountered in the production of epoxy resins, Arch Dermatol 1955, Vol. 71, 212 - 213.

⁷⁵ Büchner, St.A., Kontaktdermatitis, Schweiz Med Forum 2001, Vol. 18, 458 - 463.

an einem gesättigten Zentrum (z.B. bei Epoxiden und Alkylhalogenen), die nucleophile Substitution und an einem ungesättigten Zentrum (z.B. bei aromatischen Halogenen oder Estern) und die nucleophile Addition (z.B. bei Carbonsäurederivaten und α,β -ungesättigten Systemen).⁷⁶ Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Epoxide und deren Derivate ergeben sich daraus folgende mögliche Reaktionen (Abb. 2.25):

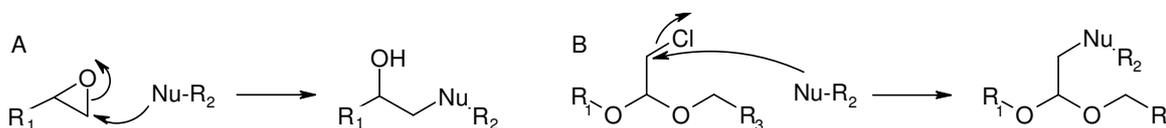


Abb. 2.25: Reaktionen an gesättigten Zentren, A) Reaktion mit einer Epoxidgruppe, B) Reaktion mit einem Alkylhalogen, R_{1,3}...Aryl-, Alkylrest, R₂...Proteinrest⁷⁷

Die Diagnose von Kontaktallergien erfolgt mittels des so genannten Epikutantests (Patch-Test, Läppchentest). Dabei werden dem Patienten bevorzugt auf dem Rücken Pflaster platziert, über die eine Exposition über 24 oder 48 h mit verschiedenen Testsubstanzen erfolgt.⁷⁸ Die Konzentration der zum Test eingesetzten Standardsubstanzen liegt in der Regel zwischen 0,25 – 1 % in einem Trägermaterial, wie z.B. Wasser oder Vaseline. Von der Deutschen Kontaktallergiegruppe (DKG) wurden verschiedene Testreihen zusammengestellt. Neben einer Standardreihe, welche die am häufigsten ursächlichen Allergene, unter anderem auch ein Epoxidharz enthält, können weitere auf bestimmte Berufsgruppen spezifizierte Testreihen (z.B. Testreihe: Kunstharze/Kleber, enthält u. a. 5 Reaktivverdünner) eingesetzt werden.⁷⁹

In den Jahren 1992 bis 2000 lag die Häufigkeit einer positiven Reaktion auf Epoxidharze bei insgesamt 75089 getesteten Personen in den IVDK (Informationsverbund Deutscher Kliniken) - Kliniken bei durchschnittlich 1,2 % (\approx 900 Betroffene).⁶ Dabei zeigten vor allem Patienten mit regelmäßiger beruflicher Exposition, wie z.B. Kunststoffverarbeiter, Maler, Lackierer, Maurer oder Bauarbeiter eine überdurchschnittlich hohe Sensibilisierungsprävalenz. Entsprechende Hauterscheinungen treten dabei nicht nur an den Händen, den Unterarmen und an Unter- und Oberschenkeln auf, sondern auch sehr häufig im Gesicht- und Halsbereich, ausgelöst durch Dämpfe, Stäube oder Aerosole.⁸⁰

In den Jahren 1996/1997 waren Epoxidharze bereits die zweithäufigste Ursache für Kontaktallergien bei männlichen Beschäftigten in der Bauwirtschaft (Abb. 2.26).⁸⁰

⁷⁶ Basketter, D.; Dooms-Goossens, A.; Karlberg, A.T.; Lepoittevin, J.P., The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic, Contact dermatitis 1995, Vol. 37, 65 - 73.

⁷⁷ Heimrich, M., Charakterisierung von Epoxidverbindungen für die Entwicklung von Epikutantests (Kontaktekzemdiagnostik), Diplomarbeit 2006, Technische Universität Dresden.

⁷⁸ Schnuch, A.; Aberer, W.; Agathos, M.; Brasch, J.; Frosch, P.J.; Fuchs, Th.; Richter, G., Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) zur Durchführung des Epikutantests mit Kontaktallergenen, Der Hautarzt 2001, Vol. 52, 864 - 866.

⁷⁹ DKG - Deutsche Kontaktallergie-Gruppe e.V., Epikutantestreihen der DKG Stand Oktober 2006, http://www.ivdk.gwdg.de/dkg/Stand_Feb_2007.

⁸⁰ Goergens, U., Erkrankungen durch Epoxidharze - Erfahrungen der Bau-Berufsgenossenschaft, Workshop des Unterausschusses IV Arbeitsplatzbewertung - 25. Juni 2001, Bau-Berufsgenossenschaft Frankfurt am Main.

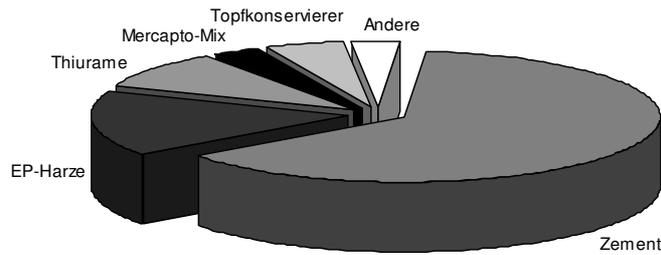


Abb. 2.26: Ursachen allergischer Kontaktekzeme bei männlichen Beschäftigten, $n_{\text{ges.}} = 364$, modifiziert⁸⁰

Mögliche Ursache der Kontaktallergien können jedoch neben Harzen auf BADGE-Basis, auch BFDGE-, epoxidierte cycoaliphatische Harze und Reaktivverdünner sein. So konnte von Geier et al.⁸¹ im Rahmen der EPOX 2002 – Studie beobachtet werden, dass Butandioldiglycidylether (BDDGE) und Hexandioldiglycidylether (HDDGE), nach den aromatischen Epoxidharzen, die zweithäufigste Ursache für eine Allergie waren (Tab. 2.1). Jedoch auch andere Reaktivverdünner wie p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGD), Phenylglycidylether (PGE) und Cresylglycidylether (CGE) zeigten bei einer Reihe von Patienten positive Reaktionen.

Tab. 2.1: positiven Reaktionen auf ausgewählte Testsubstanzen der EPOX 2002 – Studie, (n = 92)

	Epoxidverbindung	positive Reaktionen [%]
Harze	BADGE-Harz*	55,2
	BFDGE-Harz	43,7
	cycloaliphatisches Epoxidharz*	3,4
Reaktivverdünner	1,6-Hexandioldiglycidylether* (HDDGE)	19,5
	1,4-Butandioldiglycidylether* (BDDGE)	18,4
	p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)	11,5
	Phenylglycidylether* (PGE)	11,5
	Cresylglycidylether* (CGE)	6,8
	Butylglycidylether* (BGE)	3,4
	Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)*	2,3

*...kommerziell erhältliche Testsubstanzen

Nur 5 % aller Patienten, die auf BFDGE-Harze positiv reagierten, zeigten keine Reaktion bei BADGE-Harzen. Ebenso konnten Kreuzreaktivitäten bei den nur um 2 Methylgruppen differierenden aliphatischen Reaktivverdünnern HDDGE und BDDGE beobachtet werden. Auch bei den strukturell sehr ähnlichen Verbindungen PGE/BADGE-Harz und PGE/CGE lassen die Ergebnisse der Studie Kreuzreaktivitäten vermuten.

⁸¹ Geier, J.; Lessmann, H.; Hillen, U.; Jappe, U.; Dickel, H.; Koch, P.; Frosch, P.J.; Schnuch, A.; Uter, W., An attempt to improve diagnostics of contact allergy due to epoxy resin systems. First results of the multicentre study EPOX 2002, Contact Dermatitis 2004, Vol. 51, 263 - 272.

Die im Moment zur Verfügung stehenden kommerziell erhältlichen Testsubstanzen spiegeln nur einen Bruchteil der Epoxidverbindungen wieder, die zurzeit in industriellen und handwerklichen Betrieben eingesetzt werden. Es ist somit nicht auszuschließen, dass Kontaktallergien gegen Epoxidverbindungen seltener diagnostiziert werden als sie eigentlich sind.

Im Fall der Testzubereitung „Epoxidharz“ der Standardreihe der DKG handelt es sich um ein unmodifiziertes mittelviskoses Epoxidharz auf Basis von BADGE mit einem mittleren Molekulargewicht von 380 – 390 Da.⁸² Allgemein nimmt das Sensibilisierungspotential mit zunehmender Kettenlänge ab. Bei hochmolekularen Epoxidharzen oder Festharzen besteht somit nur eine geringe Gefahr, z. B. durch zu gering ausgehärtete Materialien, zur Auslösung allergischer Kontaktekzeme.

Schwierig bei der Testung von Reaktivverdünnern ist ihre mögliche chemische Heterogenität, so dass ihre genaue Zusammensetzung zunächst analysiert werden und gegebenenfalls getrennt auf Einzelsubstanzen getestet werden muss.⁸³

2.3 Rechtliche Grundlagen

2.3.1 Migration

Werden Lebensmittel in Verpackungen in den Verkehr gebracht, so sind in der Regel Wechselwirkungen mit Transportvorgängen zwischen beiden Komponenten zu beobachten. Der Übergang von Stoffen (Migration) aus der Verpackung ins Lebensmittel beruht auf Diffusion. Dieser Vorgang folgt dem 2. Fick'schen Gesetz, welches die Zunahme der Konzentration im Füllgut in Abhängigkeit von der Zeit, der Dicke des Kunststoffes und vom Diffusionskoeffizienten beschreibt (Gl. 2.1).

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \cdot \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad \begin{array}{l} c... \text{ Konzentration des Migranten im Kunststoff} \\ t... \text{ Zeit} \\ D... \text{ Diffusionskoeffizienten} \\ x... \text{ Dicke des Kunststoffes} \end{array} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Beim Übergang von Stoffen aus der Verpackung ins Lebensmittel wird zwischen Gesamtmigration und spezifischer Migration unterschieden. Unter der Gesamtmigration wird die Summe aller Verbindungen, die aus einem Bedarfsgegenstand während seiner Kontaktzeit mit dem Lebensmittel in dieses übergeht, verstanden. Die spezifische Migration konzentriert sich dagegen auf die Stoffmenge einer bestimmten Substanz oder Substanzgruppe, die nach Ablauf einer bestimmten Kontaktzeit mit dem Bedarfsgegenstand auf das Lebensmittel übergeht.¹

⁸² Geier, J., Epoxidharz-Allergien aus dermatologischer Sicht - Erkrankungen laut Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IDVK), Workshop des Unterausschusses IV Arbeitsplatzbewertung - 25. Juni 2001, Bau-Berufsgenossenschaft Frankfurt am Main.

⁸³ Peiler, D.; Rustemeyer, T.; Frosch, P.J., Kunststoffe – chemische Grundlagen, Verwendung und Bedeutung als Kontaktallergene, Dermatol. Beruf Umwelt 2000, Vol. 48, Nr. 3, 82 - 104.

Von besonderem Interesse sind Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da, da von diesen, infolge einer möglichen Absorption im Gastrointestinaltrakt, ein toxikologisches Risiko ausgeht. Substanzen über 1000 Da werden dagegen nur zu 1 % absorbiert.⁸⁴

Für die Ermittlung des Stoffüberganges werden, aufgrund der sehr aufwendigen und schwierigen Analyse des eigentlichen Lebensmittels unter realen Migrationsbedingungen, Simulanzlösemittel verwendet. Dabei simulieren die nach Richtlinie 85/572/EWG vorgegebenen Flüssigkeiten unter den in der Richtlinie 97/48/EG festgelegten Standardversuchsbedingungen weitgehend die Migrationsbedingungen, die beim Kontakt zwischen Bedarfsgegenstand und realem Lebensmittel auftreten können.^{85, 86} Es erfolgt eine Unterscheidung in vier Lebensmittelgruppen, die mit unterschiedlichen Simulanzien getestet werden (Tab. 2.2). Unter Berücksichtigung der in der Praxis auftretenden Einsatzbedingungen von Konservendosen ist vor allem zum Zeitpunkt der Sterilisation ein erhöhter Übergang von Substanzen auf das Lebensmittel zu erwarten. Die Sterilisationstemperaturen liegen abhängig vom verwendeten Verfahren zwischen 90 – 125 °C bei einer Zeit von bis zu einer Stunde. In Anlehnung daran wurden für die Migrationsuntersuchungen die in Tab. 2.2 aufgeführten Reaktionsbedingungen festgelegt.

Tab. 2.2: Migrationssimulanzien und Reaktionsbedingungen

Lebensmittel	Simulanz	Simulanztyp	Reaktionsbedingungen
wässrige Lbm., pH < 4,5	bidestilliertes Wasser	A	1 h bei 121 °C
wässrige Lbm., pH > 4,5	3 % Essigsäure	B	1 h bei 121 °C
alkoholische Lbm.	10 % Ethanol	C	1 h bei 121 °C
fettige Lbm.	rektifiziertes Olivenöl	D	1 h bei 121 °C
	95 % Ethanol	D a)	4 h bei 60 °C

Speziell für Milcherzeugnisse wurde allerdings nachgewiesen, dass destilliertes Wasser als Simulanzlösemittel wenig geeignet ist. Gemäß der Richtlinie 2007/19/EG sollte daher 50 %iges Ethanol verwendet werden, da es die Fetteigenschaften dieser Produkte besser simuliert.⁸⁷

Die Angabe der Konzentration des Migranten erfolgt in mg/dm² Verpackungsoberfläche oder in mg/kg Lebensmittel. Zur Vereinheitlichung der auf dem Markt vorhandenen, in der Form sehr unterschiedlichen Lebensmittelverpackungen wurde das Oberflächen-Volumenverhältnis standardisiert auf einen Würfel von 1 dm³, der 1 l oder 1 kg Lebensmittel umschließt.

⁸⁴ Note for Guidance for Food Contact Materials, European Food Safety Authority 08. Juni 2006.

⁸⁵ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 85/572/EWG des Rates vom 19. Dezember 1985 über die Liste der Simulanzlösemittel für Migrationsuntersuchungen von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 372/14.

⁸⁶ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 97/48/EG der Kommission vom 29. Juli 1997 zur zweiten Änderung der Richtlinie 82/711/EWG des Rates über die Grundregeln zur Ermittlung der Migration von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 222/10.

⁸⁷ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2007/19/EG der Kommission vom 30. März 2007 zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, und der Richtlinie 85/572/EWG des Rates über die Liste der Simulanzlösemittel für die Migrationsuntersuchungen von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 91/17.

Die Kontaktfläche zwischen Lebensmittel und Verpackung beträgt somit 6 dm². Als spezifisches Gewicht wird für alle Simulanzlösemittel ein Wert von 1 g/cm³ angenommen.⁸⁸

Die zulässige Gesamtmigration wird durch die Richtlinie 2002/72/EG auf maximal 60 mg/kg bzw. 10 mg/dm² begrenzt.

2.3.2 spezifische Migrationslimits

In der Europaratsresolution AP (2004) 1 ist eine Liste von Ausgangsstoffen erstellt worden, die zur Herstellung von Beschichtungen verwendet werden.⁸⁹ Die Bewertung hinsichtlich der Migration von Stoffen ist bei Beschichtungen schwierig, da für ihre Herstellung in den wenigsten Fällen die gelisteten Monomere sondern bereits teilvernetzte Harze eingesetzt werden. Somit könnte sowohl das verwendete Harz aber auch das dafür eingesetzte Monomer als Ausgangsstoff angesehen werden und somit Angriffspunkt für die Bewertung sein. Toxikologisch relevant können aber auch Zwischenprodukte des Harzes sein.⁹⁰

Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind mit Lebensmitteln in Kontakt zu kommen, sind im nationalen Rahmen durch die Bedarfsgegenständeverordnung rechtlich geregelt.⁹¹ Verpackungen, die nicht vollständig aus Kunststoff bestehen, werden von dieser jedoch nicht berücksichtigt, so dass für diese die auf europäischer Ebene allgemeine Rahmenverordnung 1935/2004/EG gilt.⁹² Bezüglich BADGE, BFDGE und NOGE und einiger ihrer Derivate wurde daher, aufgrund zunächst unzureichend vorliegender toxikologischer Daten, der bereits für Kunststoffe geltende Grenzwerte von 1 mg/kg durch die Richtlinie 2002/16/EG auch für Lebensmittelbedarfsgegenstände mit Oberflächenbeschichtungen, z. B. Konservendosen übernommen und deren Verwendung zeitlich begrenzt.⁹³ Mit der seit 01.01.2006 in Kraft getretenen Verordnung 1895/2005/EG wurde jedoch letztgenannte Richtlinie aufgehoben und neue spezifische Migrationsgrenzwerte festgelegt.⁹⁴ Der Grenzwert für BADGE-Chlorhydrine wird darin aufgrund ungeklärter Genotoxizität *in vivo* mit 1 mg/kg weiterhin aufrechterhalten. BADGE und seine hydrolysierten Derivate werden dagegen gemäß neuer toxikologischer Untersuchungen als cancerogen und mutagen wenig bedenklich eingestuft. Infolge dessen wurde der spezifische Migrationsgrenzwert auf 9 mg/l festgelegt. Für BFDGE und NOGE erfolgte keine neue Bewertung, so dass ihre Verwendung ab 01.01.05 gemäß der Richtlinie 2002/16/EG nicht mehr erlaubt ist.⁹³

⁸⁸ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2002/72/EG der Kommission vom 6. August 2002 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 220/18.

⁸⁹ Council of Europe: Framework Resolution ResAP (2004) 1 on coatings intended to come into contact with foodstuffs, adapted by the committee of Ministers on 1 December 2004.

⁹⁰ Frede, W., Taschenbuch für Lebensmittelchemiker, Lebensmittel – Bedarfsgegenstände – Kosmetika – Futtermittel, 2. Auflage, Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2006.

⁹¹ Bedarfsgegenständeverordnung, i. d. F. d. Bek. vom 23.12.1997 (BGBl. 1998 I S. 5) zuletzt geänd. durch die dreizehnten Verordnung zur Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung v. 20.12.2006 (BGBl. I. S. 3381).

⁹² Verordnung (EG) Nr. 1935/2004 des Europäischen Parlaments und der Rates vom 27. Oktober 2004 über Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen und zur Aufhebung der Richtlinien 80/590/EWG und 89/109/EWG.

⁹³ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2002/16/EG der Kommission vom 20. Februar 2002 über die Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 51/27.

⁹⁴ Verordnung (EG) Nr. 1895/2005 der Kommission vom 18. November 2005 über die Beschränkung der Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Amtsblatt der Europäischen Union, L302/28.

Für phenolische Verbindungen wie Phenol, Kresol oder Bisphenol A liegen keine individuellen Rechtsgrundlagen für Materialien mit Oberflächenbeschichtungen vor. Das spezifische Migrationslimit für Bisphenol A ist in der Bedarfsgegenständeverordnung mit 0,6 mg/kg festgelegt. Kresolisomere sind zur Herstellung von Lebensmittelbedarfsgegenständen aus Kunststoffen uneingeschränkt zugelassen. BPF oder andere höhermolekulare Phenole werden in keiner Rechtsgrundlage mit Bezug auf Lebensmittelkontakt aufgeführt.

2.4 Analytik

Für die Charakterisierung von Kunstharzen stehen verschiedene klassische und moderne Analysen- und Prüfmethode zur Verfügung. Die methodische Vielfalt erlaubt eine sehr differenzierte Beurteilung der physikalischen und chemischen Natur der Kunstharze. Die rationellen und praxisnahen normierten Methoden sind z. T. Bestandteil der Produktspezifikationen und dienen als Routineverfahren in der Qualitätsüberwachung. Im Bereich der Umweltanalytik werden sie oft zur Bestimmung von toxikologisch relevanten Verbindungen in Summe eingesetzt. Sie geben in der Regel Auskunft über die physikalischen Eigenschaften der Harze aber auch über Monomerrestgehalte. Spezielle meist instrumentell gestützte Bestimmungsmethoden werden dagegen zur Aufklärung der genauen chemischen Beschaffenheit, bei Herstellungs- oder Verarbeitungsproblemen sowie zur Ermittlung von Eigenschaftszusammenhängen angewendet.

2.4.1 Phenolharze

Normierte Methoden

Für zahlreiche Fragestellungen existieren standardisierte Methoden wobei oft für einen Parameter eine Auswahl verschiedener Analyseverfahren zur Verfügung steht.

Zu den Routineverfahren für die Ermittlung allgemeiner physikalischer Eigenschaften gehören unter anderem die Bestimmung des Schmelzbereiches bei Pulverharzen (ISO 3146), der Dichte (ISO 2811, 3675), der Viskosität (ISO 3219, 2555, 12058), des pH-Wertes (ISO 8975), der elektrischen Leitfähigkeit (ISO 9944) und der Wasserverdünnbarkeit (ISO 8989). Eine Auswahl der normierten Methoden zur chemischen Charakterisierung von Phenolharzen ist z. B. die Bestimmung der Härtecharakteristik, des Gehaltes an nicht flüchtigen Anteilen (ISO 8618), des freien Phenols (ISO 8974) und Formaldehyds (ISO 9397, 9020, 11402) sowie des Wassergehaltes (ISO 760).¹² Ein wichtiger Parameter für die Vernetzung eines Phenolresols sind die Hydroxylgruppen. Entsprechend der DIN-Methode 53 240 werden diese durch Titration nach Acetylierung bestimmt. Eine Unterscheidung zwischen phenolischer und methylolischer Hydroxylgruppen ist dabei allerdings nicht möglich.⁹⁵

Bei normierten Methoden erfolgt die Bestimmung von Substanzen in einer Matrix oft summarisch. Die bezüglich des Phenolgehaltes beschriebenen Analysemethoden beruhen dabei vorrangig auf einer Substitution am Benzolring. Eine im Bereich von Wasser-, Abwasser- und

⁹⁵ DIN 53 240, Bestimmung der Hydroxylzahl, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Dezember 1971, Beuth Verlag, Berlin.

Schlammuntersuchungen angewendete DIN-Methode ist der Phenol-Index - eine Summenmethode zur Bestimmung phenolischer Verbindungen in der Matrix Wasser. Phenole bilden dabei mit 4-Aminoantipyrin in Verbindung mit Kaliumperoxidsulfat einen Antipyridinfarbstoff, welcher photometrisch bei 460 oder 510 nm bestimmt wird.⁹⁶

Erfasst werden dabei jedoch nicht nur Phenole, sondern auch andere oxidativ kupplungsfähige wasserdampfliche Verbindungen. Des Weiteren reagieren nicht alle Phenole in gleicher Weise mit dem Farbreagenz.

So konnten Neufeld und Paladino⁹⁷ zeigen, dass methylierte und ethylierte Phenole wesentlich weniger reaktiv sind als reines Phenol und diesbezüglich vor allem para-substituierte Verbindungen sehr langsam oder auch gar nicht reagieren. Außerdem wiesen die substituierten mit 4-Aminoantipyrin umgesetzten Phenole eine geringere Absorption im Gegensatz zu Phenol auf (Abb. 2.27). Bei einem Mix aus verschiedenen phenolischen Verbindungen wird somit, bei dieser auf der Kalibration von Phenol basierenden Analytik, eine geringere Konzentration bestimmt als tatsächlich in der Probe enthalten ist.

Ebenso unspezifisch sind die beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Phenole durch Bromsubstitution oder der Umsetzung mit Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen. Auch dabei erfolgt jeweils die Substitution am Benzolring, welcher jedoch bei Phenolresolen überwiegend durch Methylolgruppen blockiert ist.

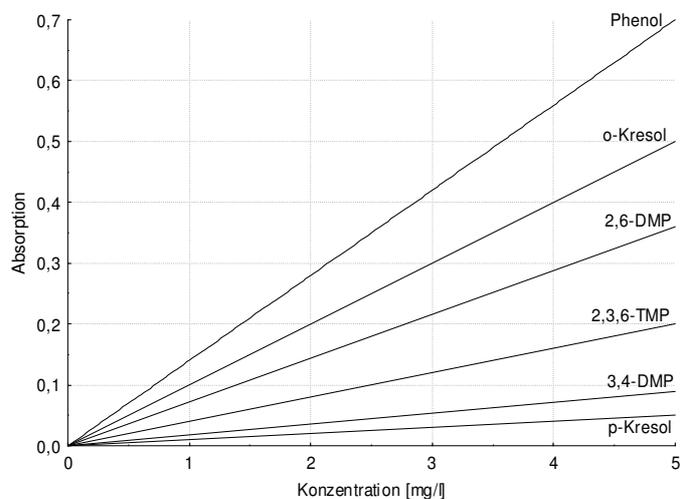


Abb. 2.27: Absorption verschieden substituierter Phenole nach Reaktion mit 4-Aminoantipyrin, modifiziert⁹⁷

Auch dabei erfolgt jeweils die Substitution am Benzolring, welcher jedoch bei Phenolresolen überwiegend durch Methylolgruppen blockiert ist.

Aufgrund dieser Störungen durch andere chemisch ähnliche Substanzen, durch bereits vorliegende Substitution und der unterschiedlichen ökologischen Relevanz der Verbindungen sind konkrete Aussagen zur Qualität, Quantität und damit verbundener Toxikologie ohne substanzspezifische Trenn- und Analysetechniken nicht möglich.

Spezifische Methoden

Eine sehr leistungsfähige instrumentelle Analysenmethode zur Bestimmung des Kondensationsgrades aber auch zur Aufklärung der Monomersequenz, der chemischen Zusammensetzung sowie der Konfiguration und der Polymerketten-Konformation von Kunstharzen

⁹⁶ DIN-Norm 38409 Teil 16, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H), Bestimmung des Phenol-Index (H 16), DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Juni 1984, Beuth Verlag, Berlin.

⁹⁷ Neufeld, R.D.; Paladino, S.B., Comparison of 4-aminoantipyrine and gas-liquid chromatography techniques for analysis of phenol compounds, J - Water Pollut Control Fed 1985, Vol. 57, No. 10, 1040 - 1044.

ist die Kernresonanzspektroskopie (NMR).⁹⁸ So beschrieben Pasch et al.⁹⁹ die Zuordnung der ¹³C-NMR-Signale zu speziellen Strukturmerkmalen, wodurch es möglich war, zwischen Hydroxymethylgruppen, Halbacetalen und Dimethylethergruppen eindeutig zu unterscheiden. Bouajila et al.¹⁰⁰ untersuchten den Einfluss von verschiedenen polymerisierenden Erhitzungszyklen auf den Fortschritt der Vernetzung mittels ¹³C-NMR. Detailliert werden von ihnen die einzelnen chemischen Verschiebungen und deren korrespondierenden Gruppen beschrieben.

Im Hochfeldbereich (15 - 20 ppm) der Spektren sind die Banden der ortho und/oder para Methylgruppen lokalisiert. Eine etwas größere chemische Verschiebung (34 - 39 ppm) weisen dagegen die Signale der para-ortho und para-para Methylenverbrückungen auf. Die Intensität der folgenden Banden im Bereich um 62 - 67 ppm, welche den ortho und para Hydroxymethylgruppen zugeordnet werden, korrespondiert stark mit dem Grad der Vernetzung. So verringern sich diese Peaks bzw. verschwinden ganz während des Härtungsprozesses. Unterschiede in der chemischen Verschiebung zeigen sich auch bezüglich der Signale von ortho- (70 ppm) und para- (77 ppm) Methylengruppen der Dimethylenetherbrücken. Des Weiteren sind die freien nicht substituierten ortho- und para-Kohlenstoffatome des Ringes im Spektrum in den Bereichen um 115 bzw. 120 ppm erkennbar.

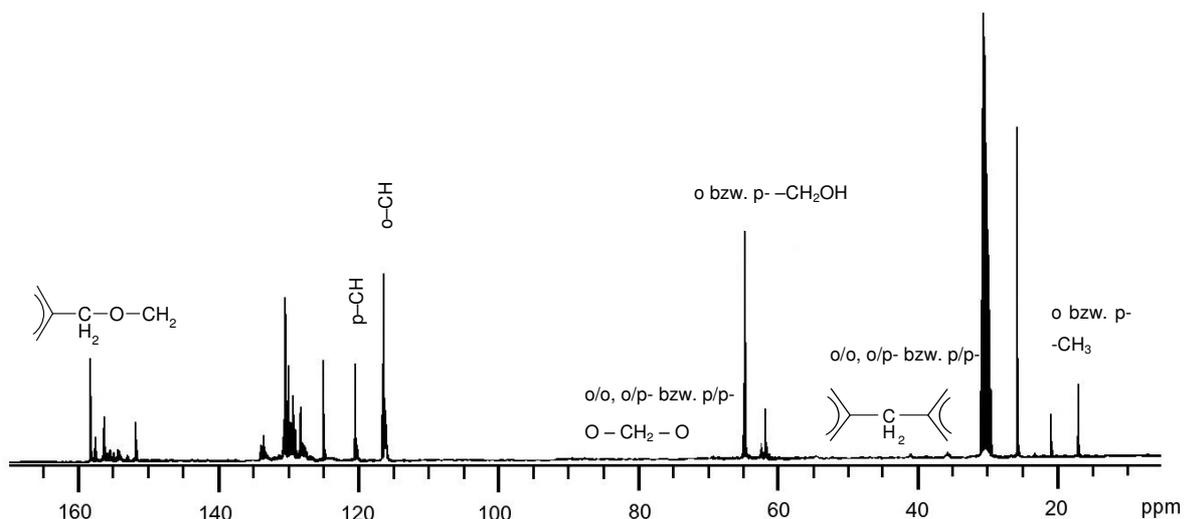


Abb. 2.28: ¹³C-NMR Spektrum eines Phenolresols mit 2,4,6-Trimethylphenol als Standard, modifiziert¹⁰¹

Die im Tieffeld gelegenen Banden (~ 156 ppm) sind den Phenoxyethergruppen zuzuordnen und vor allem im fortgeschrittenen Härtungsprozess infolge der Kondensation von Hydroxylgruppen des aromatischen Ringes (150 ppm) und Hydroxymethylgruppen zu beobachten.¹⁰⁰ Bouajila et al.¹⁰¹

⁹⁸ Schrod, M., Neue Methoden zur Synthese und Analyse von Phenol-Formaldehyd-Harzen, Technische Universität Darmstadt, Dissertation 2002.

⁹⁹ Pasch, H.; Goetzky, P.; Raubach, H., ¹³C-NMR-Untersuchungen an Phenol-Formaldehyd-Harzen, 3. Zur Bildung von Dimethylenetherstrukturen in Phenol-Resolen, Acta Polym 1983, Vol. 34, Nr. 3, 150 - 152.

¹⁰⁰ Bouajila, J.; Raffin, G.; Waton, H.; Sanglar, C.; Paise, J.O.; Grenier-Loustalot, M.F., Phenolic resins (II) – Influence of the Chemical Structure of High Molecular Weight Molecules on the Mechanisms of Cross-linking and on the Final Structure of the Resins, Polym & Polym Compos 2003, Vol. 11, No. 4, 233 - 262.

¹⁰¹ Fisher, T.H.; Chao, P.; Upton C.G.; Day, A.J., One- and Two-Dimensional NMR Study of Resol Phenol-Formaldehyd Prepolymer Resins, Magn Reson Chem 1995, Vol. 33, 717 - 723.

kamen mit ihrer Untersuchungen somit zu ähnlichen Ergebnisse wie Fisher et al.¹⁰², die mit ein- und zweidimensionaler NMR verschiedene Standardverbindungen sowie kommerzielle Phenol-Formaldehyd-Resole analysierten. In weiteren ¹³C-NMR Studien untersuchte Fisher et al.¹⁰² speziell Methylolderivate von 2- und 4-Hydroxyphenylringen auf ihre Verschiebungen der Ipos-Kohlenstoffatome im Tieffeldbereich von 150 bis 160 ppm sowie die Signale der Methylenbrücken und Methylolgruppen (Abb. 2.28).

Obwohl die ¹H-NMR im Vergleich zur ¹³C-NMR einen wesentlich geringeren Bereich der chemischen Verschiebung umfasst und somit weniger detaillierte Informationen liefert, werden auch deren Resonanzen zur Strukturaufklärung von Phenolharzen eingesetzt. Kopf und Wagner¹⁰³ nutzten die ¹H-NMR, um Zwischenprodukte der Novolaksynthese sowie den Mechanismus der Härtungsreaktion mit Hexamin zu untersuchen. Sie ordneten dabei die Methylenprotonen der Dihydroxydiphenylmethane den Signalen im Bereich 3,5 - 4,0 ppm zu. Die Peaks der Region 4,4 - 4,7 ppm korrespondieren mit den Protonen der Methylengruppen von ortho- oder para-Methylolphenolen. Die ebenfalls in den ¹H-NMR-Spektren vorhanden Banden im Bereich um 6,8 und 7,1 ppm sind den aromatischen Wasserstoffatomen in ortho- und para-Position zur phenolischen Hydroxylgruppe bzw. dem meta ständigen Wasserstoff zuzuordnen (Abb. 2.29).¹⁰¹

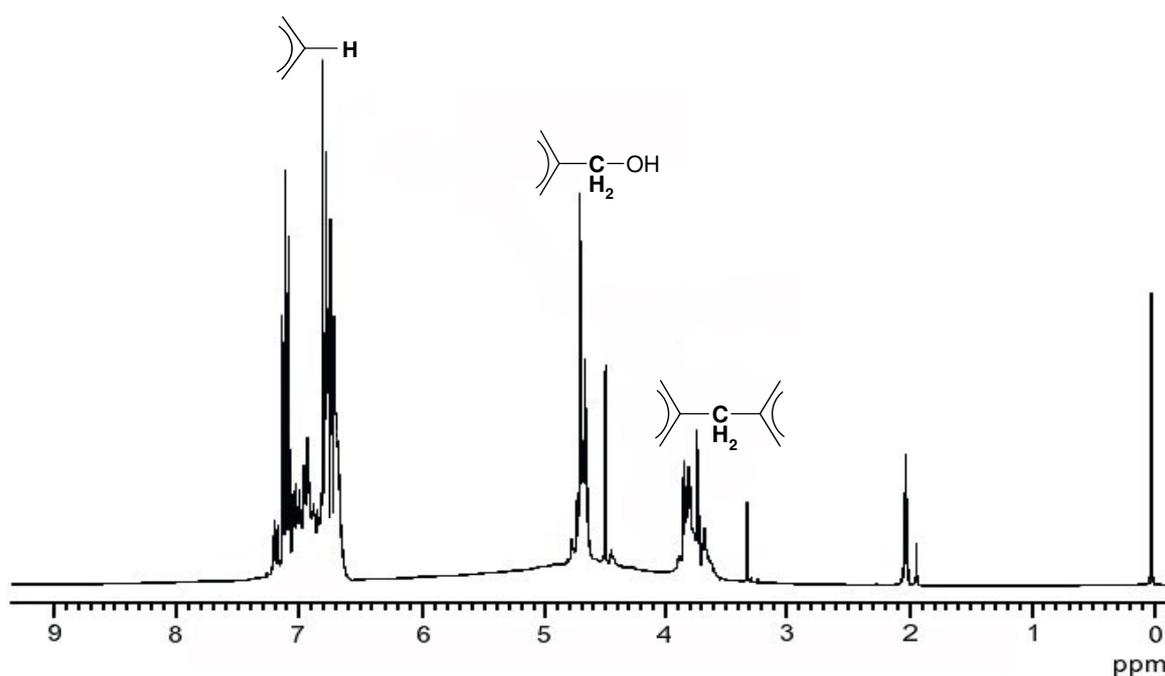


Abb. 2.29: ¹H-NMR-Spektrum eines Phenolharzes, modifiziert¹⁰⁴

¹⁰² Fisher, T.H.; Chao, P.; Upton C.G.; Day, A.J., Spectral Assignments and Reference Date – A ¹³C NMR study of the methylol derivatives of 2,4'- and 4,4'-dihydroxydiphenylmethanes found in resol phenol-formaldehyde resins, Magn Reson Chem 2002, Vol. 40, 747 - 851.

¹⁰³ Kopf, P.W.; Wagner, E.R., Formation and Cure of Novolacs: NMR Study of Transient Molecules, J Polym Sci 1973, Vol. 11, 939 - 960.

¹⁰⁴ Scariah, K.J.; Usha, K.M.; Narayanaswamy, K.; Shanmugam, K.; Sastri, K.S., Evaluation of Isomeric Composition of Resol-Typ Phenol Formaldehyde Matrix Resins for Silica-Phenolic Composites and Its Effect on Cure Characteristics of the Resin, J App Polym Sci 2003, Vol. 90, 2517 - 2524.

Qualitative und semiquantitative Informationen bezüglich Kondensation, Modifikation und thermischer Härtung von Harzen können auch mit dem Einsatz der IR-Spektroskopie erhalten werden. Holopainen et al.¹⁰⁵ untersuchten mittels Infrarot (IR) -Spektroskopie in Kombination mit ¹³C-NMR den Gehalt an freiem Phenol, die Anwesenheit von Methylolgruppen und Dimethylenetherbrücken sowie das molare Verhältnis von Formaldehyd zu Phenol. Vor allem die Bereiche 4000 - 2500 und 1800 - 400 cm⁻¹ sind im Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR) interessante Regionen. Mit steigender Kondensation der Phenolharze reduziert sich die Anzahl der Hydroxylgruppen und somit auch die Intensität der breiten FTIR-Bande um 3600 - 3100 cm⁻¹. Die Intensität der Bande um 1355 cm⁻¹ korrespondiert mit den Hydroxylgruppen von primären Alkoholen, deren Anzahl im Harz ebenfalls mit steigender Temperatur der Härtungsreaktion abnimmt. Die Intensität der Elongationsbanden der Methylene (Hydroxymethylgruppen, Methylenbrücken, sowie Dimethyletherbrücken) in den Wellenlängenbereichen 2990 und 2820 cm⁻¹ variieren dagegen aufgrund ihrer Stabilität während den Polymerisationszyklen nur gering. Die Reaktion der Dimethylenetherbrücken und der CH₂OH-Gruppen zu Methylenbrücken während der Härtung der Harze ist verantwortlich für die sinkende Intensität der für diese Gruppen charakteristischen Banden zwischen 1100 und 950 cm⁻¹. Im Fingerprintbereich der IR-Spektren ist anhand der Signale im Bereich 860 - 770 cm⁻¹ der Typ der Substitution des aromatischen Ringes ermittelbar (Abb. 2.30).¹⁰⁶

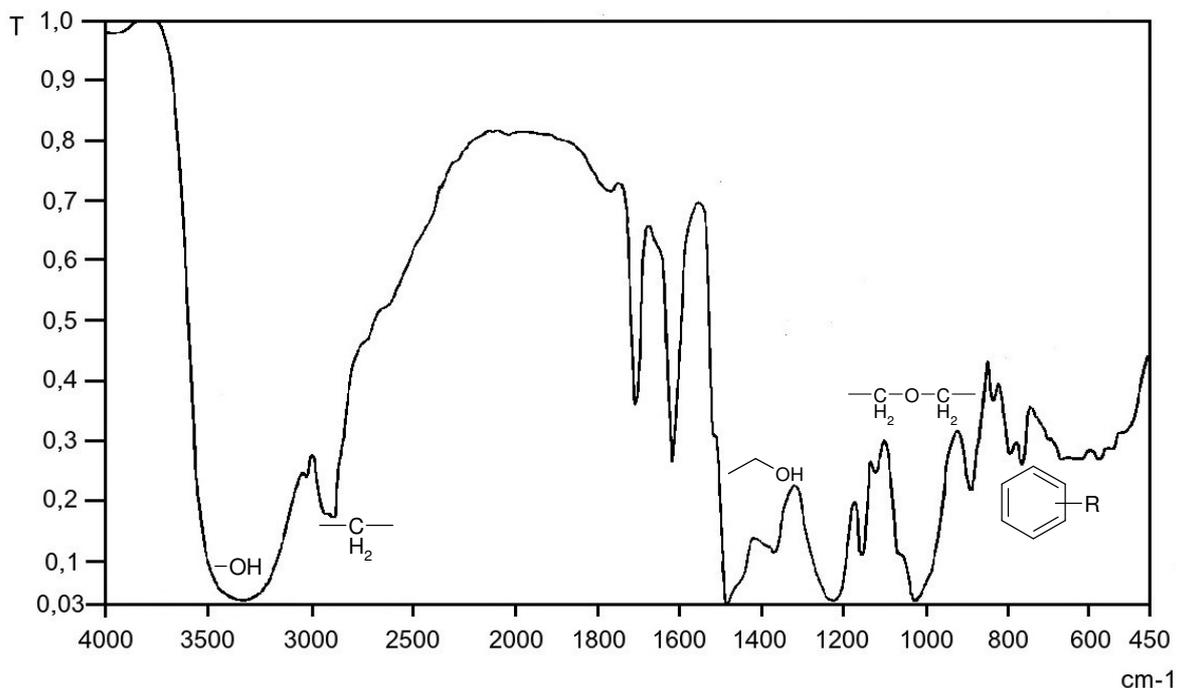


Abb. 2.30: IR-Spektrum eines Phenolharzes, modifiziert¹⁰⁵

¹⁰⁵ Holopainen, T.; Alvila, L.; Rainio, J.; Pakkanen, T.T., IR Spectroscopy as a Quantitative and Predictive Analysis Method of Phenol-Formaldehyd Resol Resin, J App Polym Sci 1998, Vol. 69, 2175 - 2185.

¹⁰⁶ Bouajila, J.; Raffin, G.; Waton, H.; Sanglar, C.; Alamerçery, S.; Grenier-Loustalot, M.F., Phenolic resins (III) – Solid State Structures and Thermal Properties of Cross-linked Phenolic Resins, Polym & Polym Comp 2003, Vol. 11, No. 4, 263 - 276.

Im UV besitzen Phenolharze Absorptionsbanden bei 254 und 280 nm, wobei jedoch Verschiebungen der Banden aufgrund von anderen Harzkomponenten oder Substitutionen zu beobachten sind.¹⁴

Neben den spektroskopischen Analysemethoden finden die chromatographischen Trenntechniken wie die Dünnschichtchromatographie (DC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und GC in Verbindung mit verschiedensten Detektionsmethoden in vielen Arbeiten Anwendung.

Zur Ermittlung der Rohstoffbasis (Phenol, Kresol, Alkylphenol etc.) und der Kondensationsart (sauer oder basisch) eines Harzsystems wird unter anderem die Verwendung der DC beschrieben. Schindlbauer und Dabernig¹⁰⁷ verwenden zur Auftrennung und Identifizierung löslicher Harzbestandteile zwei aufeinander folgende eindimensionale Entwicklungen auf Kieselgelplatten. Doch auch mittels zweidimensionaler DC, wobei in der einen Laufrichtung bevorzugt die Trennung nach Molekulargewicht und in der anderen Laufrichtung nach Polarität erfolgt, ist die Bestimmung der Rohstoffbasis eines Harzes möglich.

Die Ermittlung des Harztypes ist für die Interpretation vieler Parameter ein wichtiges Kriterium. So ist die Abschätzung des Kondensationsgrades über die Viskosität nur bei Harzen des gleichen Typs möglich, da vorhandene Hydroxymethylengruppen sowie Dimethylenetherbrücken einen großen Einfluss auf die Viskosität haben. Ebenso vom Harztyp abhängig ist die Breite der Molmassenverteilung von Phenolharzen. Die meist mittels Gelpermeations- bzw. Ausschlusschromatographie (GPC/SEC) bestimmte Eigenschaft kann dabei Werte von mehr als 50000 Da annehmen.¹⁴ Die Molmassenverteilung kann zum einen ein Mittel zur Prozesskontrolle sein, zum anderen liefert sie aber auch wichtige Informationen bezüglich der toxikologischen Relevanz der Harze.

So ist es möglich mittels GPC den Anteil der Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 1000 Da zu bestimmen, welche wie beschrieben von Bedeutung bezüglich der Toxikologie sein können. Die GPC erfolgt an porösem Material, meist basierend auf Divinylbenzol vernetztem Polystyrol. Die Trennung erfolgt dabei nach der relativen Größe bzw. nach dem hydrodynamischen Radius der Moleküle und damit weitgehend nach Molekulargewicht. Die SEC liefert ein nach der Molmasse der enthaltenen Komponenten aufgetrenntes Gesamtbild der Harze, welches sich in drei Bereiche einteilen lässt.¹⁰⁸ Im geringmolekularen Bereich können in den meisten Fällen substanzspezifische Aussagen getroffen werden. So

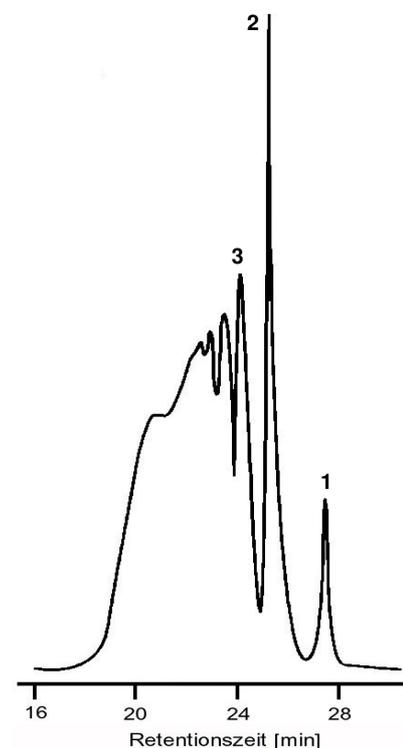


Abb. 2.31: SEC-Chromatogramm eines Novolakes; 1...Phenol, 2...Dimer, 3...Trimer; modifiziert¹³

¹⁰⁷ Schindlbauer, H.; Dabernig, G. Eine einfache Charakterisierung von Harzgemischen mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie, *Fresenius Z Anal Chem* 1984, Vol. 319, 399 - 402.

¹⁰⁸ Biedermann, M.; Grob, K., Phenolic resins for can coatings: I. Phenol-based resole analysed by GC-MS, GCxGC, NPLC-GC and SEC, *LWT-Food Sci Technol* 2006, Vol. 39, No. 6, 633 - 646.

sind z. B. Informationen über die enthaltenen Konzentrationen an Phenol oder Hydroxymethylphenolen möglich.¹⁴ Im mittleren Molekulargewichtsbereich der Chromatogramme werden die Kondensate nicht mehr vollständig aufgetrennt, können aber z. T. dennoch den Gliedern einer homologen Reihe von Mehrfachverbindungen zugeordnet werden.¹⁰⁹ Hochmolekulare Verbindungen eluieren kompakt zusammen im dritten Abschnitt des Chromatogrammes (Abb. 2.31). Die Kalibrierung kann im niedermolekularen Bereich mit Monomeren oder Oligomeren unterschiedlicher Kettenlänge erfolgen. Polystyrolstandards können die Basis für die Kalibrierung im hochmolekularen Bereich sein.¹⁶

Ausführliche Arbeiten zur Identifizierung von Harzinhaltsstoffen über die Monomere hinaus führten Bouajila et al.^{110, 100} u. a. mittels LC/UVD/MSD und LC/UVD/MSD/MSD durch. Basis der Charakterisierung verschiedener Mono-, Di- und Trimere sowie höherer Derivate waren dabei, mittels Überschuss an Formaldehyd unter Variation von pH-Wert und Katalysator synthetisierte Resole. Beschrieben wird eine Abhängigkeit der Fragmentierung von der Anzahl und der Position der Substituenten sowie der Art der Brückenbindungen der Oligomeren. Unterschiedliche Fragmentierungsmechanismen von Mono-, Di- und Trimeren durch den Abgang von Gruppen, wie H₂, H₂O, CH₂O, CO, C₂H₂ sowie der Spaltung der Dimethylenetherbrücken, werden dabei zur Strukturaufklärung genutzt. Für die jeweiligen Abgangsgruppen werden Reaktionsmechanismen vorgeschlagen. Die Beobachtung, dass sowohl 2,6-Dihydroxymethylphenol als auch 2,4,6-Trihydroxymethylphenol jeweils 2 Moleküle H₂ abspalten, 2-Hydroxymethylphenol und 2,4-Dihydroxymethylphenol jedoch nur 1 Molekül H₂ zeigt, dass die Anzahl an ortho-CH₂OH-Gruppen die Menge an abzuspaltenden H₂-Molekülen vorgibt. Die Abspaltung von H₂O erfolgt bevorzugt bei der Anwesenheit von ortho-CH₂OH-Gruppen, doch auch beim Vorliegen von para-CH₂OH-Gruppen konnte die Eliminierung von H₂O beobachtet werden. Während die Abspaltung von CO und C₂H₂ primär nach der eines Moleküls H₂O erfolgt, kann die Eliminierung von H₂ vor der Abspaltung von H₂O und umgekehrt erfolgen. Beobachtet wurde jedoch auch, dass einige der Oligomeren nicht zu kurzkettingeren Bestandteilen aufspalten, was die Autoren dem Vorliegen von Verbrückungen zuschreiben, die schwieriger fragmentieren als Dimethylenetherbrücken. Die Monomere Phenol und 4-Hydroxymethylphenol zeigten gar keine Response bei der verwendeten negativen APCI-MSD.¹⁰⁰

Im Gegensatz zu Bouajila et al.^{100, 110} charakterisierten Biedermann und Grob¹¹¹ Phenolharze überwiegend mittels Gaschromatographie (GC/MSD) sowie zweidimensionaler GC (GCxGC-FID). Wobei sie die Komponenten der Resole vorrangig über ihre molekulare Masse in Kombination mit ihrem chromatographischen Retentionsverhalten identifizierten. Das Grundmonomer der Harze sowie bei alkylierten Verbindungen die Position der Alkylgruppe am Ring waren Biedermann und Grob¹¹¹ dabei bekannt. Aus Vorversuchen ergab sich außerdem, dass die Harzkomponenten keine butylierten phenolischen Hydroxylgruppen enthielten. Aufgrund gleicher Fragmente bei der

¹⁰⁹ Braun, D.; Arnt, J., Analyse der monomeren Komponenten in Phenol-Formaldehyd-Kondensaten, Fresenius Z Anal Chem 1979, Vol. 294, 130 -134.

¹¹⁰ Bouajila, J.; Raffin, G.; Waton, H.; Sanglar, C.; Paisse, J.O.; Grenier-Loustalot, M.F., Phenolic resins - Characterization and kinetic studies of different resols prepared with different catalysts and formaldehyde/phenol ratios (I), Polym & Polym Comp 2002, Vol. 10, No. 5, 341 - 359.

¹¹¹ Biedermann, M.; Grob, K., Phenolic resins for can coatings: II. Resoles based on cresol/phenol mixtures or tert. butyl phenol, LWT-Food Sci Technol 2006, Vol. 39, No. 6, 647 - 659.

Abspaltung von Trimethylsilylgruppen bzw. Trimethylsilanolgruppen und anderen Abgangsgruppen der Verbindungen wurden die verwendeten Standardverbindungen und Harze neben einer Trimethylsilylierung auch einer tert-Butyl-Dimethylsilylierung unterzogen. Die zweidimensionale GC wurde zusätzlich, unterstützend zur Identifizierung verwendet. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit wird vor allem die Detektion von Minorcomponenten stark verbessert. Biedermann und Grob^{108, 111} konnten somit über 170 Verbindungen in Phenol, Kresol/Phenol sowie in tert-Butylphenol basierenden Harzen identifizieren. Eine Unterscheidung von Isomeren war aufgrund unterschiedlicher Massenspektren möglich, eine entsprechende Zuordnung jedoch nicht.

Nachteil der GC gegenüber der HPLC ist die limitierte chromatographische Trennung bezüglich des Molekulargewichtes. So können nur Verbindungen mit einer molekularen Masse bis etwa 700 Da erfasst werden, während der Bereich der toxikologischen relevante Substanzen jedoch bis etwa 1000 Da reicht. Die GC-Analyse ist allerdings wesentlich leistungsfähiger bei der Trennung der einzelnen Verbindungen und daher für die Identifizierung vor allem von Isomeren geeigneter als die HPLC.¹¹¹

In den meisten Arbeiten dienen die beschriebenen analytischen Methoden der Aufklärung von Bildungsmechanismen, dem Ablauf der Reaktionskinetik, dem Verhalten der Harze bei der Vernetzung oder der Identifizierung der enthaltenen Substanzen. Nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigten sich bisher mit der Quantifizierung der phenolischen Verbindungen. In den Arbeiten von Bouajila et al.¹⁰⁰ wurde für die Extraktion von unterschiedlich gehärteten Harzen, der Anteil der Oligomere mit $n = 2$ und $n = 3$ bezüglich der extrahierten Verbindungen im Methanolextrakt etwa zu 50 % und bei der Verwendung von H_2O sogar bis zu 90 % bestimmt. Die Gesamtmenge der Monomere belief sich dagegen in den Extrakten auf maximal 2,5 %. Keine Aussagen wurden jedoch über das prozentuale Verhältnis der löslichen Verbindungen zum Rückstand getroffen. Fisher et al.¹⁰¹ nutzten die ^{13}C -NMR unter Verwendung eines internen Standards zur Quantifizierung. Neben dem in den kommerziellen Resolen enthaltenen Lösungsmittel Isopropylalkohol sowie freiem Formaldehyd werden verschiedene Mono- und Dimeren aber auch die Summe einzelner Substanzgruppen wie z.B. Hydroxybenzylether, Dibenzylmethane oder Benzylether quantifiziert.

Biedermann und Grob¹⁰⁸ nahmen die Abschätzung der Gehalte der im untersuchten Resol enthaltenen Komponenten mittels GC-MSD (TIC) vor. Der Anteil der detektierbaren Verbindungen unter Berücksichtigung des Lösungsmittelgehaltes wird dabei mit etwa 60 - 65 % angegeben. Die verbleibenden 35 - 40 % des Resols sind aufgrund eines zu hohen Molekulargewichtes mittels GC nicht detektierbar.¹⁰⁸

Zur Bestimmung phenolischer Substanzen in wässrigen Migrationslösungen entwickelten Brauer und Funke^{112, 113} eine Multimethode. Dabei werden die im Prüflebensmittel Wasser befindlichen Phenole, überwiegend Monomere, nach Anreicherung an einer hydrophoben Cyclohexyl-Festphasen-Extraktionssäule mittels HPLC bestimmt. Zur vollständigen Retardierung der

¹¹² Brauer, B.; Funke, T., Bestimmung phenolischer Substanzen in wässriger Migrationslösung, Dtsch Lebensm-Rundsch 1992, Vol. 88, Nr. 8, 243 - 246.

¹¹³ Brauer, B.; Funke, T., Nachweis und Bestimmung phenolischer Substanzen in wässrigen Migraten von Kunststoffbedarfsgegenständen – Modifizierung –, Dtsch Lebensm-Rundsch 1995, Vol. 91, Nr. 5, 146 - 147.

unterschiedlich polaren Verbindungen werden dabei die hydrophoben Wechselwirkungen durch Bildung von Ionenpaaren und Aussalzen verstärkt. Brauer und Funke^{112, 113} gelang es mit dieser Methode 34 Phenole, darunter Phenol, die Kresolisomere, BPF und BPA, mit Wiederfindungen zwischen 60 und 99 % zu bestimmen. Es war damit möglich, die in der damals geltenden Richtlinie 90/128/EWG in einer Gesamtpositivliste aufgeführten Monomere und deren Migrationsgrenzwerte im Prüflebensmittelsimulanz Wasser nachzuweisen und zu überprüfen.¹¹⁴ Die Methode ist jedoch auf die Bestimmung hydrophiler phenolischer Substanzen aus wässriger Lösung beschränkt und gibt somit keine Informationen zum Migrationsverhalten höher molekularer Verbindungen.

Im Allgemeinen liegt das Hauptaugenmerk bei den amtlichen Migrationsuntersuchungen auf den zur Harzherstellung eingesetzten Monomeren. Höher molekularere Oligomere die eine molare Masse von unter 1000 Da besitzen und somit toxikologisch relevant sind, besitzen neben dem Parameter der Gesamtmigration keine spezifische rechtliche Grundlage.

Derivatisierung von Hydroxylgruppen

In der vorliegenden Arbeit sollten, ähnlich wie bei Biedermann und Grob^{108, 111}, für in Resolen enthaltene phenolische Verbindungen mit Hilfe ihre molekulare Masse, ihrer Fragmentierung sowie der Information zur Anzahl und dem Typ der vorhandenen Hydroxylgruppen Strukturvorschläge erstellt werden. Zur Unterscheidung der Hydroxylgruppen standen verschiedene Derivatisierungsmöglichkeiten zur Auswahl, welche sowohl methylole und phenolische aber auch nur phenolische OH-Gruppen erfassen. So ist bei den Derivatisierungen mit aktivierten Säuren oder Halogeniden (z. B. 4-Chlor-7-Nitrobenzofuranon (NBD-Chlorid)), bei der Veresterung mit Säurechloriden (z. B. Acetylchlorid), Säurenitrilen, Säureanhydriden (z. B. Essigsäureanhydrid) oder Isocyanaten (z. B. Phenylisocyanat) eine Differenzierung zwischen den beiden Hydroxylgruppen nicht möglich. Werden die Verbindungen dagegen mit einem Sulfonylhalogenid (z. B. Dansylchlorid) umgesetzt, reagieren nur die phenolischen OH-Gruppen.

2.4.2 Epoxidharze

Normierte Methoden

Analog zu den Phenolharzen existieren auch für die Analytik von Epoxidharzen normierte Methoden, mit denen sich überwiegend die makroskopischen Eigenschaften der Polymere als Summenparameter bestimmen lassen. Allgemeine Prüfverfahren sind u. a. nach DIN EN ISO 7142 die Bestimmung der Farbe (ISO 4630, 6271), der Viskosität (ISO 3219), der flüchtigen und nicht flüchtigen Anteile (ISO 3251), des Flammpunktes (ISO 1523, 3679), des Epoxidäquivalentes (ISO 3001), der Hydroxylzahl (ISO 7142), des Gesamt-Chlorgehaltes (ISO 4615), des leicht verseifbaren

¹¹⁴ EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 90/128/EWG der Kommission vom 23. Februar 1990 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 75/19. Durch die RL 2002/72/EG der Kommission vom 06. August 2002 (ABl. L 220 vom 15. August 2002) außer Kraft gesetzt.

Chlores (ISO 4583), des Schmelzpunktes (ISO 1218), sowie des Erweichungspunktes (ISO 4625).¹¹⁵

Das Epoxidäquivalent ist eine Kenngröße, deren Größe die notwendige Menge an Härter bestimmt, welche zur Aushärtung bzw. zur optimalen Vernetzung von Epoxidharzen erforderlich ist. Die Bestimmung nach DIN EN ISO 3001 beruht auf der Umsetzung der Epoxidgruppen mit Bromwasserstoff.¹¹⁶ Aus dem Verbrauch des Halogenwasserstoffs bei der Titration wird anschließend der Epoxidgehalt berechnet. Des Weiteren ist es mit Hilfe des Epoxidäquivalentes möglich, das mittlere Molekulargewicht abzuschätzen.

Der Chlorgehalt ist ein Qualitätsparameter für die Herstellung des Epoxidharzes. Eine falsche Dehydrohalogenierung wird durch einen hohen Chlorgehalt angezeigt.¹¹⁷

Als Amtliche Methode zur Bestimmung von BADGE und BADGE·2HCl in Lebensmitteln wird die Methode § 64 L 00.00.51 verwendet.¹¹⁸

Spezifische Methoden

Viele in der Literatur beschriebenen Untersuchungsmethoden sind auf die Analytik von Epoxidharzen, insbesondere den Basismonomeren und deren Reaktionsprodukten ausgerichtet.

Sehr umfangreich ist dabei im Gegensatz zu den migrierenden phenolischen Verbindungen die Migration von Epoxiden untersucht wurden.

Die Bestimmung der aus den Verpackungen migrierenden Verbindungen in Lebensmitteln kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits können die relevanten Verbindungen in den in Kapitel 2.3.1 aufgeführten Simulanzlösemittel bestimmt werden, andererseits kann eine Untersuchung am Lebensmittel selbst erfolgen. Während die Verwendung der Simulanzien die Analytik wesentlich vereinfacht und schnell Ergebnisse liefert, spiegelt die direkte Untersuchung des Lebensmittels durch die Berücksichtigung der jeweiligen Matrix die tatsächliche Belastung wieder. Im Gegensatz zum geringen Aufwand bei der Analyse der migrierenden Verbindungen in Simulanzlösemitteln ist für die Bestimmung in realen matrixbelasteten Proben eine umfangreiche Aufarbeitung nötig. Diesbezüglich werden in der Literatur verschiedene Methoden wie z. B. die Verwendung der Festphasenextraktion, der Lösungsmittlextraktion, der Flüssig-Flüssig-Extraktion oder der Festphasenmikroextraktion beschrieben.^{119, 120, 121, 122}

¹¹⁵ DIN EN ISO 7142, Bindemittel für Beschichtungsstoffe - Epoxidharze - Allgemeine Prüfverfahren, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. September 2004, Beuth Verlag, Berlin.

¹¹⁶ DIN EN ISO 3001, Kunststoffe - Epoxidverbindungen - Bestimmung des Epoxid-Äquivalentes, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. November 1999, Beuth Verlag, Berlin.

¹¹⁷ Ulbrich, V., Problematik, gegenwärtiger Stand und Entwicklung der chemischen Analyse auf dem Gebiet der Synthese von Epoxidverbindungen und Epoxidharzen, *Plaste Kautsch* 1968, Vol. 15, Nr. 8, 546 - 549.

¹¹⁸ Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LMBG, L 00.00-51 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von BADGE und BADGE·2HCl in Lebensmitteln, 2005.

¹¹⁹ Brede, C.; Skjevrak, I.; Herikstad, H.; Ånensen, E.; Austvoll, R.; Hemmingsen, T., Improved sample extraction and clean-up for the GC-MS determination of BADGE and BFDGE in vegetable oil, *Food Addit Contam* 2002, Vol.19, No. 5, 483 - 491.

¹²⁰ Berger, U.; Oehme, M.; Girardin, L., Quantification of derivatives of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and novolac diglycidyl ether (NOGE) migrated from can coatings into tuna by HPLC/fluorescence and MS detection, *Fresenius J Anal Chem* 2001, Vol. 369, 115 - 123.

¹²¹ Vílchez, J.L.; Zafra, A.; González-Casado, A.; Hontoria, E.; del Olmo, M., Determination of trace amounts of bisphenol F, bisphenol A and their diglycidyl ethers in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry, *Ana Chim Acta* 2001, Vol. 431, 31 - 40.

Das Hauptaugenmerk der Bestimmungsmethoden zur Migration von Epoxiden liegt einerseits auf der Quantifizierung der rechtlich geregelten Monomere und andererseits auf der Identifizierung der migrierenden Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da.

Zunächst wurde vor allem der Übergang von nicht gebundenen BADGE aus Materialien für Mikrowellen geeignete Verpackungen untersucht, da Epoxiden als Additive für diese Verwendung finden. Sharman et al.¹²³ bestimmten mittels GC-MSD in entsprechend verpackten Pizzen bis zu 3000 mg/kg des Diglycidylethers. Wenig später folgte die Analyse von in Konservendosen verpackten Lebensmitteln. So wurden u. a. in der Arbeitsgruppe um Biedermann et al.¹²⁴ in mehreren Fisch-in-Öl Produkten mit LC-LC-FID z. T. sehr hohe Gehalte an BADGE bestimmt, welche die rechtlich festgelegten Höchstwerte um ein Vielfaches überschritten.

In den meisten Migraten ist jedoch der Anteil von BADGE und BFDGE sowie ihren hydrolysierten und hydrochlorierten Derivaten an den migrierenden Verbindungen mit einem Molekulargewicht bis zu 1000 Da eher gering. So können neben diesen oft eine Vielzahl an höheren Oligomeren oder Reaktionsprodukten mit Phenolen oder Lösungsmitteln bestimmt werden.^{125, 126}

Als Summenparameter für alle Verbindungen mit BADGE- bzw. BFDGE-ähnlicher Struktur kann der Anteil der Fraktionen < und > 1000 Da mittels SEC ermittelt werden.¹²⁷ Diese recht einfache Methode stellt eine Alternative zur gravimetrischen Bestimmung der Gesamtmigration dar, mit den Vorteilen einer wesentlich geringeren Nachweisgrenze und einer höheren Präzision.¹²⁸

Neben den Analysen zur Quantifizierung und Identifizierung spielt auch der Aspekt, dass migrierende Verbindungen mit Bestandteilen der verpackten Lebensmittel reagieren können eine wichtige Rolle. Paseiro-Losada et al.¹²⁹ beschrieben diesbezüglich die Hydrolyse von BADGE in auf Wasser basierenden Lebensmittelsimulanzien in Abhängigkeit der Temperatur. Neben dieser am häufigsten zu beobachtenden Reaktion konnte die Umsetzung der Epoxidgruppe auch mit

¹²² Nerín, C.; Philo, M.R.; Salafrance, J.; Castle, L., Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 2002, Vol. 963, 375 - 380.

¹²³ Sharman, M.; Honeybone, C.A.; Jickells, S.L.; Castle, L., Detection of residues of the epoxy adhesive component BADGE in microwave susceptors and its migration into food, *Food Addit Contam* 1995, Vol. 12, 779 - 787.

¹²⁴ Biedermann, M.; Grob, K.; Bronz, M.; Curcio, R.; Huber, M.; Lopez-Fabal, F., Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) in Edible-Oil-Containing Canned Foods: Determination by LC-LC-Fluorescence Detection, *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 1996, Vol. 87, 547 - 558.

¹²⁵ Biedermann, M.; Grob, K.; Böhler, P.; Widmer, H.R., Identification of Migrants from Coatings of Food Cans and Tubes: Reaction Products of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) with Phenols and Solvents, *Mitt Gebiete Lebensm. Hyg.* 1998, Vol. 89, 529 - 547.

¹²⁶ Schaefer, A.; Simat, T.J., Migration from can coatings: Part 3. Synthesis, identification and quantification of migrating epoxy-based substances below 1000 Da, *Food Addit Contam* 2004, Vol. 21, No. 4, 390 - 405.

¹²⁷ Bronz, M.; Biedermann, M.; Grob, K., Characterization of Migrates from Can Coatings by Size Exclusion Chromatography; Total Amounts of Phenolics with Molekular Weight below 1000 D, *Mitt. Gebiete Lebensm Hyg* 1998, Vol. 89, 327 - 338.

¹²⁸ Schaefer, A.; Maß, S.; Simat, T.J.; Steinhart, H., Migration from can coatings: Part 1. A size-exclusion chromatographic method for the simultaneous determination of overall migration and migrating substances below 1000 Da, *Food Addit Contam* 2004, Vol. 21, No. 3, 287 - 301.

¹²⁹ Paseiro-Losada, P.; Simal Lozano, J.; Paz Abuín, S.; López Mahía, P.; Simal Gándara, J., Kinetics of the hydrolysis of Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in water-based food simulants - Implications for legislation on the migration of BADGE-Typ epoxy resins into foodstuffs, *Fresenius J Anal Chem* 1993, Vol. 345, 527 - 532.

Chloriden aus Lebensmitteln und Magensaftsimulanzien gezeigt werden.¹³⁰ Darüber hinaus wurden Lebensmittel- und Serumproteine als Reaktionspartner von BADGE ermittelt.¹³¹

Da bisher jedoch keine Summenmethode zur Unterscheidung zwischen Verbindungen mit noch intakten und somit reaktionsfähigen Epoxidgruppen und bereits umgesetzten Derivaten besteht, ist keine Aussage zum Reaktionspotential eines Migrates möglich.

Auf dem Gebiet der Forschungen zur Sensibilisierung der Haut durch Epoxidharze identifizierten Ponten et al.¹³² relevante Verbindungen wie BADGE und die Isomere von BFDGE mittels DC und HPLC. Da die Ursache für Kontaktekzeme hauptsächlich bei Substanzen von einer molaren Masse von bis zu 400 Da liegt, ist die Bestimmung dieser neben der HPLC auch mittels GC möglich. So bestimmte Henriks-Eckermann¹³³ den Gehalt von BADGE in Epoxidharzen mittels GC-FID.

Die zur Vernetzung verwendeten Reaktivverdünner, besonders die aliphatischen Verbindungen, bleiben jedoch weitgehend unberücksichtigt. Aufgrund der fehlenden chromophoren bzw. fluorophoren Gruppen ist der Einsatz flüssigkeitschromatographischer Bestimmungsmethoden unter Verwendung von UV- oder FI-Detektion nicht möglich. Meyer et al.¹³⁴ kombinierten zur Bestimmung aromatischer und aliphatischer Reaktivverdünner die HPLC mit der FTIR-Spektroskopie. Das Detektionslimit wird dabei durch die intensiven Banden im Bereich geringerer Wellenlängen bestimmt, während die schwachen Banden der Fingerprintregion die Informationen für die Identifizierung der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen liefert. Zur Anwendung kamen dabei sowohl eine on-line Methode, mit einer IR-Flußzelle, als auch ein off-line System, bei dem der Eluent auf einen KBr-Pressling gesprüht und anschließend das Lösungsmittel entfernt wurde. Vorteil der off-line Methode ist das geringere Detektionslimit, da keine starken Absorptionsbanden des Lösungsmittels wichtige Bereiche des Spektrums überlagern. So konnte z. B. der aliphatische Reaktivverdünner Neopentylidiglycidylether in einer Konzentration von 0,5 % mittels off-line Detektion nachgewiesen werden.

Weitgehend universell einsetzbar, da unabhängig von spektroskopischen Eigenschaften sind dagegen der RI- und der Verdampfungslichtstreuungsdetektor (ELSD – evaporative light scattering detector), welcher in der vorliegenden Arbeit zur Detektion der aliphatischen Reaktivverdünner verwendet wurde. Das Funktionsprinzip dieses Detektors lässt sich in drei Schritte gliedern: die Verneblung des Eluentens, die Verdampfung des Lösungsmittels sowie die eigentliche Detektion der Substanzen (Abb. 2.32). Im Vernebler wird der aus der Chromatographiesäule ankommende Eluentenstrom mit Gas versetzt, i. d. R. Stickstoff, und in ein Aerosol überführt.

¹³⁰ Richard, N.; Biedermann, M.; Grob, K., Reaction of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) from Can Coatings with Food Components, *Mitt. Lebensm Hyg* 1999, Vol. 90, 532 - 545.

¹³¹ Petersen, H., Bisphenol-A-Diglycidylether: Vorkommen, Ersatzstoffe und Reaktionen mit Lebensmittelbestandteilen, Universität Hamburg, Dissertation 2003.

¹³² Ponten, A.; Zimerson, E.; Sörensen, Ö; Bruze, M., *Chemicla analysis of monomers in epoxy resins based on Bisphenol F and A, Contact Dermatitis* 2004, Vol. 50, 289 - 297.

¹³³ Henriks-Eckermann, M.L., Gas chromatographic determination of the oligomer of molecular weight 340 in epoxy resins, *J Chromatogr* 1982, Vol. 244, 378 - 380.

¹³⁴ Meyer, U.; Salzer, R.; Raddatz, J., HPLC-FTIR identification of reactive diluents in epoxy resins, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* 1991, Vol. 52, 261 - 268.

Die im Verneblungsprozess erzeugte Tröpfchengröße hat dabei einen unmittelbaren Einfluss auf die entstehende Partikelgröße bei der anschließenden Verdampfung, von welcher wiederum die Intensität der Lichtstreuung abhängig ist.¹³⁶ Die mittlere Tröpfchengröße im Aerosol wird entsprechend, der von Nukiyama und Tanasawa¹³⁷ aufgestellten empirischen Gleichung, beeinflusst durch die Oberflächenspannung, die Dichte sowie der Viskosität der Lösung, der Fließgeschwindigkeiten und der Flussraten von Verneblergas und der mobiler Phase (Gl. 2.2).

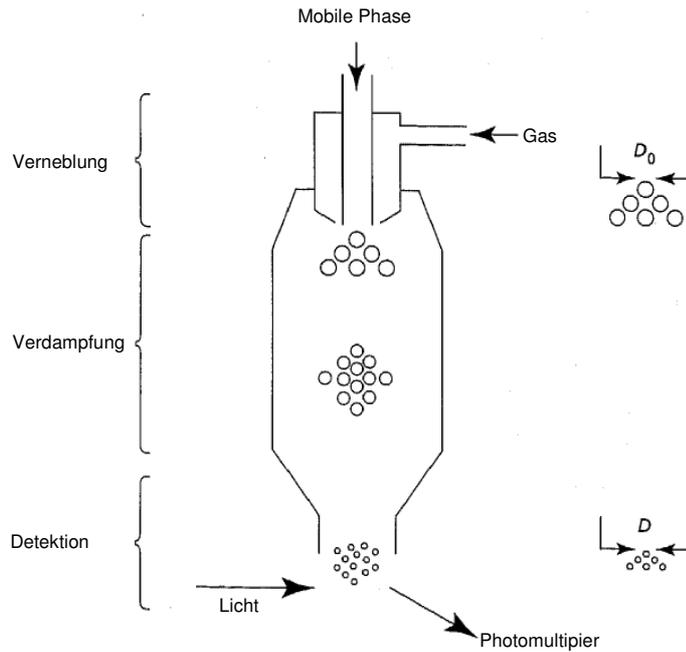


Abb. 2.32: Schema des ELSD¹³⁵

$$D_0 = \frac{585 \cdot \sqrt{\sigma}}{(v_g - v_l) \cdot \sqrt{\rho}} + 597 \left(\frac{\mu}{\sqrt{\sigma \cdot \rho}} \right)^{0,45} \cdot \left(\frac{1000 \cdot Q_l}{Q_g} \right)^{1,5} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

- D₀...mittlerer Tröpfchendurchmesser
- ρ...Dichte
- σ...Oberflächenspannung
- μ...Viskosität
- v_l/v_g...Fließgeschwindigkeit des Verneblergases bzw. der mobilen Phase
- Q_l/Q_g...Flussrate des Verneblergases bzw. der mobilen Phase

Der in den feinen Nebeltröpfchen enthaltene Eluent wird anschließend in einem beheizten Rohr, der Verdampfungsstrecke, entfernt. Je größer dabei die im Verdampfer ankommenden Tröpfchen sind, desto höher ist die benötigte Temperatur in diesem Bereich. Die Größe der entstehenden Partikel ist direkt proportional der im Vernebler erzeugten Tröpfchengröße (Gl. 2.3).

$$d = D_0 \cdot \left(\frac{c}{\rho_a} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \begin{array}{l} d... \text{ Partikelgröße} \\ D_0... \text{ mittlerer Tröpfchendurchmesser} \\ c... \text{ Konzentration des Analyten im Tropfen} \\ \rho_a... \text{ Dichte des Analyten} \end{array} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Eine niedrigere Temperatur führt zu größeren Partikeln, was sich vorteilhaft auf die Intensität der Lichtstreuung auswirkt. Bei der Verwendung von Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich wird bei

¹³⁵ Dreux, M.; Lafosse, M.; Morin-Allory, L., The Evaporative Light Scattering Detector – A Universal Instrument for Non-Volatile Solutes in LC and SFC, LC/GC Int 1996, Vol. 9, 148 - 156.
¹³⁶ Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Venthey, J.-L., The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis, Trends Anal Chem 1997, Vol. 15, No. 8, 475 - 484.
¹³⁷ Nukiyama, S.; Tanasawa, Y., Trans Soc Mech Eng Jap 1938, Vol. 4, 86 (zitiert nach ¹³⁶)

einer Partikelgröße von 0,1 bis 10 μm eine maximale Lichtstreuung erreicht.¹³⁶ Die regelbare Temperatur der Verdampferkammer ermöglicht eine Anpassung an verschiedene zusammengesetzte Eluenten.

Der verbleibende nichtflüchtige Analyt wird als Mikropartikel mit dem Gasstrom weitertransportiert und gelangen so in den Detektionsteil des Gerätes. In der Detektionskammer passieren diese Mikrotropfen ein Lichtstrahlbündel. Das dadurch gestreute Licht wird von einem in einem Winkel von 120° zur Lichtquelle (Laser oder Wolframdampfampe) angeordneten Photomultiplier verstärkt.¹³⁸ Die Lichtstreuung als komplexer Prozess lässt sich je nach Wellenlänge der Strahlung sowie Größe, Gestalt und Oberflächeneigenschaften des Streuzentrums durch die Mechanismen Rayleigh-Streuung, Mie-Streuung, Reflexion und Refraktion beschreiben. Der Anteil der einzelnen Mechanismen an der gesamten Lichtstreuung hängt dabei entscheidend vom Verhältnis Partikelgröße/Wellenlänge (d/λ_{max}) ab. Ist die Größenordnung der Partikel deutlich kleiner als die Wellenlänge der Strahlung ($d/\lambda_{\text{max}} < 0,1$) überwiegt die Rayleigh-Streuung, welche auch als elastische Streuung bezeichnet wird, da die Frequenz der gestreuten Strahlung gleich der Frequenz der einfallenden Strahlung ist. Nimmt d/λ_{max} Werte zwischen 0,1 und 2 an so verzeichnet man hauptsächlich Mie-Strahlung, bei der die typische Abmessung der Streupartikel größer ist als die Wellenlänge des Lichtes. Das von mehreren Punkten der Partikel emittierte Licht verschiedener Amplituden und Phasen zeigt dabei verschiedene Interferenzen und besitzt eine Bevorzugung der Vor- und Rückwärtsstreuung, wobei mit zunehmendem Durchmesser der Partikel die Vorwärtsstreuung stärker zunimmt als die Rückwärtsstreuung. Ist das Verhältnis Partikelgröße/Wellenlänge größer als 2 überwiegt die Lichtbrechung und die Reflexion an der Oberfläche.^{139, 136} Unter Strahlungsbrechung versteht man den plötzlichen Richtungswechsel des Lichtstrahles, wenn dieser in einem bestimmten Einfallswinkel an der Grenzfläche zwischen zwei transparenten Medien unterschiedlicher Dichte eintrifft. Grund dafür ist die unterschiedliche Geschwindigkeit der Strahlung in den verschiedenen Medien. Reflexion, d. h. das Zurückwerfen von Wellen an einer Grenzfläche, tritt immer dann auf, wenn Strahlung eine Grenzfläche zwischen zwei Medien kreuzt, die sich im Brechungsindex unterscheiden.¹⁴⁰ Das Maximum an Empfindlichkeit wird bei einem d/λ_{max} Wert von 3,5 erreicht. Über 3,5 sinkt die Empfindlichkeit aufgrund der Verringerung des Oberflächen/Volumenverhältnisses der Partikel.¹³⁶

Ebenso wie die Lichtstreuung ist auch die Response des Detektors abhängig von den Partikeleigenschaften. Dabei besteht aufgrund der Unabhängigkeit von spektroskopischen Eigenschaften kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der Probe und dem gemessenen Detektorsignal.¹⁴¹ Vielmehr lässt sich für eine Vielzahl an Analyten eine exponentielle Abhängigkeit der gemessenen Signalfäche A von der Masse m des Analyten beobachten (Gl. 2.4).

¹³⁸ ECR Gesellschaft für den Vertrieb wissenschaftlicher Geräte m.b.H., Dalienweg 6, 93087 Alteglofsheim b. Regensburg, Bedienungsanleitung Verdampfungslichtstreuendetektor SEDEX Modell 75, 2001.

¹³⁹ Römpp kompakt Basislexikon Chemie; Hrsg. Falbe, J., Regitz, M., Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, Bd. 2 F - L 1998, Bd. 3 M - Re 1999.

¹⁴⁰ Skoog, D.A.; Leary, J.J., Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen, Übers. von Brendel, D. und Hoffstetter-Kuhn, S., Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 1996.

¹⁴¹ Young, C.S.; Dolan, J.W., Success with Evaporative Light-Scattering Detection, LCGC North America 2003, Vol. 21, No. 2, 120 - 128.

$$A = a \cdot m^b$$

A... Signalfäche
 a/b... Koeffizienten
 m Masse des Analyten

(Gl. 2.4)

Die Koeffizienten a und b sind dabei u. a. abhängig von der Tröpfchengröße, von der Konzentration und der Art des gelösten Analyten, von der Flussrate des Gases sowie der mobilen Phase aber auch von der Verdampfungstemperatur. Der Wert für b variiert vorrangig zwischen 0,9 und 1,8, wobei bei der Verwendung von wässrigen Eluenten hauptsächlich niedrige b-Werte, bei organischen Eluenten eher hohe b-Werte zu beobachten sind.

Aufgrund der Entfernung der mobilen Phase aus dem System ist der ELSD im Gegensatz zum RI-Detektor noch universeller einsetzbar, da er dadurch auch bei Gradientenelution verwendet werden kann. Nachteilig ist jedoch seine wesentlich geringere Empfindlichkeit im Vergleich zur UV- oder FI-Detektion und die limitierte Anwendbarkeit auf schwer flüchtige Verbindungen.

Ebenso unabhängig von spektroskopischen Eigenschaften der Probe ist der Chemilumineszenz-Stickstoff-spezifische Detektor, welcher in der vorliegenden Arbeit zur Bestätigung der Ergebnisse des ELSD's verwendet wurde. Voraussetzung für die Verwendung dieses Detektors ist jedoch das Vorhandensein von Stickstoff im Molekül. Die Detektion basiert auf der Verbrennung der, über die Chromatographiesäule aufgetrennten stickstoffhaltigen Fraktionen nach Vernebelung des Eluentenstroms mit Sauerstoff und Inertgas (Argon oder Helium) (Abb. 2.33).¹⁴²

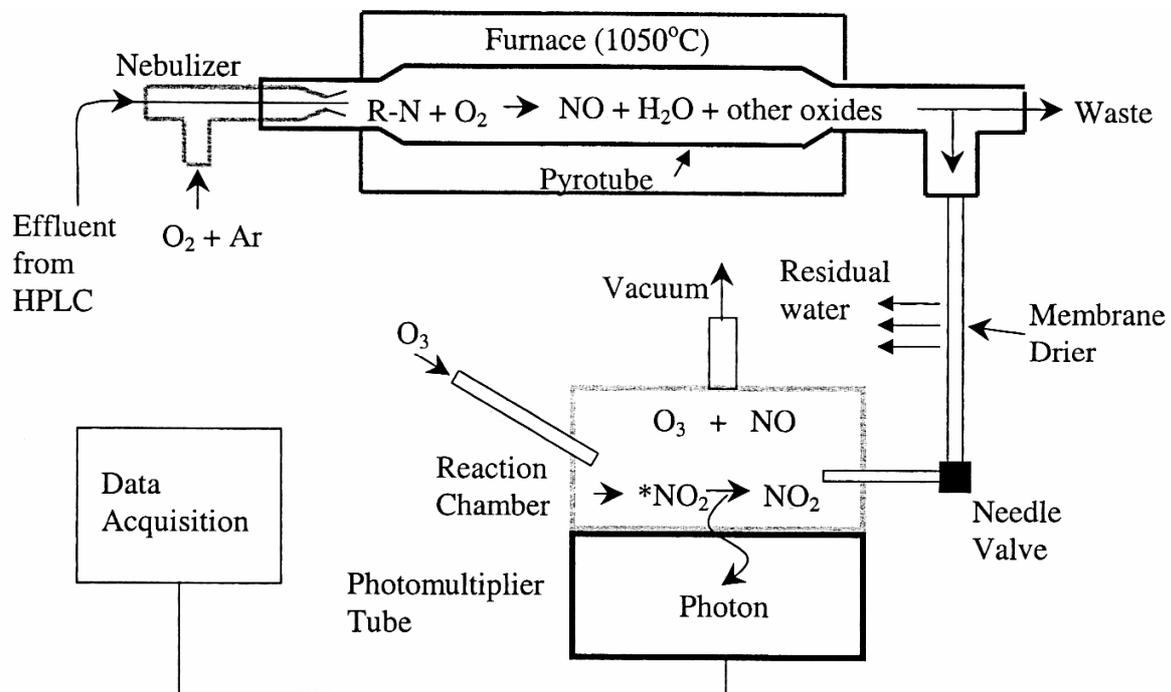


Abb. 2.33: Detektionsprinzip des CLND's¹⁴³

¹⁴² Fujinari, E.M.; Courthaudon, L.O., Nitrogen-specific liquid chromatography detector based on chemiluminescence – Application to the analysis of ammonium nitrogen in waste water, J Chromatogr 1992, Vol. 592, 209 - 214.

Bei einer Temperatur von 1050 °C werden alle organischen Verbindungen im Pyrotube zu Stickstoffmonoxid, Wasser und anderen Monoxiden verbrannt. Anschließend wird das resultierende Gas über eine Membran geleitet und somit eine Trocknung bewirkt. Im Folgenden reagiert das Stickstoffmonoxid in einer Reaktionskammer mit Ozon, wobei es zur Bildung von Stickstoffdioxid im angeregten Zustand kommt. Beim Übergang in den Grundzustand kommt es zur Emission eines Photons, welches im Photomultiplier detektiert wird. Die gemessene Chemolumineszenz ist proportional der Anzahl an Mol Stickstoffmonoxid, worüber Rückschlüsse auf den Stickstoffgehalt der Probe gezogen werden können.¹⁴³

Im Vergleich zum ELSD sind durch die Unabhängigkeit des detektierten Signals von der Struktur der Verbindungen und den geringeren Matrixeinflüssen in der Regel keine Einzelstandards, sondern nur eine stickstoffhaltige Substanz zur Kalibration nötig.¹⁴⁴

Analog zum ELSD ist jedoch auch die Anwendung des CLND durch die notwendige Verwendung flüchtiger Puffersysteme limitiert. Zusätzlich sind stickstoffhaltige Eluenten, wie Acetonitril und ammoniumhaltige Puffersysteme, welche weit verbreitet in der HPLC verwendet werden, ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu ist die Flüchtigkeit der zu untersuchenden Probe keine Voraussetzung. Wichtig sind jedoch eine vollständige Verbrennung der Probe und Reaktion zu Stickstoffmonoxid.¹⁴⁵ Die Response des Detektors ist im Idealfall äquimolar zum Stickstoffgehalt der Probe. Bei vorliegenden R-N=N-R Bindungen und elementarem Stickstoff konnte jedoch keine vollständige Umsetzung zu Stickstoffmonoxid beobachtet werden. Das Signal dieser Verbindungen ist daher geringer, als es bei Substanzen mit nicht unmittelbar benachbarten Stickstoffatomen ist. Zur Quantifizierung dieser Verbindungen ist daher eine Kalibrierung mit Standardsubstanzen notwendig.

Bezüglich der Empfindlichkeit konnte Allgeier et al.¹⁴⁵ für den CLND im Vergleich zum ELSD eine etwa vierfach höhere Sensitivität ermitteln. Das Detektionslimit wurde von Fujinari et al.¹⁴² bei IC-HPLC/CLND Analysen zu 5 ng Stickstoff bestimmt. Bei on-column Versuchen konnten Corens et al.¹⁴⁶ sogar ein Detektionslimit von 3 ng Stickstoff erreichen.

¹⁴³ Nussbaum, M.A.; Baertschi, S.W.; Jansen, P.J., Determination of relative UV response factors for HPLC by use of a chemiluminescent nitrogen-specific detector, *J Pharm Biomed Anal* 2002, Vol. 27, 983 - 993.

¹⁴⁴ Lane, S.; Boughtflower, B.; Mutton, I.; Paterson, C.; Farram, D.; Tayler, N.; Blaxill, Z.; Carmondy, C.; Borman, P., Single Calibration Quantification with HPLC? Fact or Fantasy?, *LCGC Europe* 2006, Vol. 19, No. 3, 161 - 171.

¹⁴⁵ Allgeier, M.M.; Nussbaum, A.A.; Riskey, D.S., Comparison of an Evaporative Light-Scattering Detector and a Chemiluminescent Nitrogen Detector for Analyzing Compounds Lacking a Sufficient UV Chromophore, *LCGC North America* 2003, Vol. 21, No. 4, 376 - 381.

¹⁴⁶ Corens, D.; Carpentier, M.; Schroyen, M.; Meerpoel, L., Liquid chromatography-mass spectrometry with chemiluminescent nitrogen detection for on-line quantitative analysis of compound collections: advantages and limitations, *J Chromatogr A* 2004, Vol. 1056, 67- 75.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phenolharze

3.1.1 Quantifizierung der phenolischen Verbindungen in Migraten von Polyester-Phenol-Coatings und Bestimmung der Molekulargewichtverteilung

Im Vordergrund bei den Untersuchungen der vorliegenden Polyester-Phenolcoatings standen die migrierenden phenolischen Verbindungen. Dabei war jedoch zu beachten, dass bei der Analyse im UV, wie in Abb. 3.1 deutlich zu sehen, beide Komponenten des Lackes detektiert werden. Durch diese beiderseits vorliegenden chromophoren Eigenschaften ist eine separate Bestimmung der phenolischen Bestandteile der Migrate nicht möglich. Verwendet man dagegen zur Analyse der Migrate die FL-Detektion, so werden wie in Abb. 3.2 dargestellt nur die phenolischen Verbindungen erfasst. Das Signal im Chromatogramm des Polyesterharzes im Retentionszeitbereich 20 - 25 min kann dem Lösungsmittel des Polyesters (Solvento 150/200) zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um ein Gemisch zweier aromatischer Lösungsmittel mit hohen Siedepunkten.

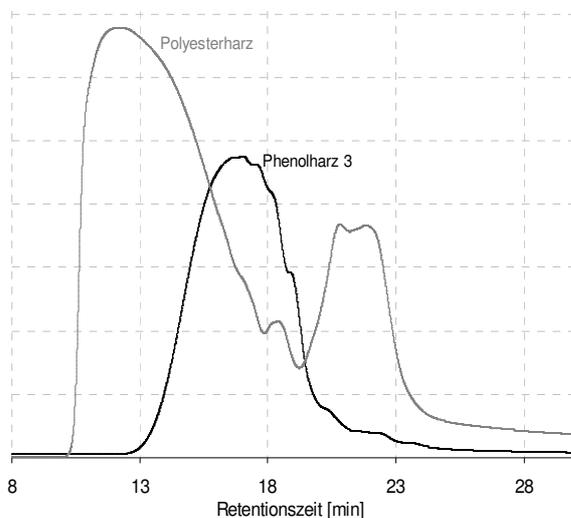


Abb. 3.1: SEC-UVD_{232nm} - Chromatogramme des Polyesterharzes und des Phenolharzes 3; chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

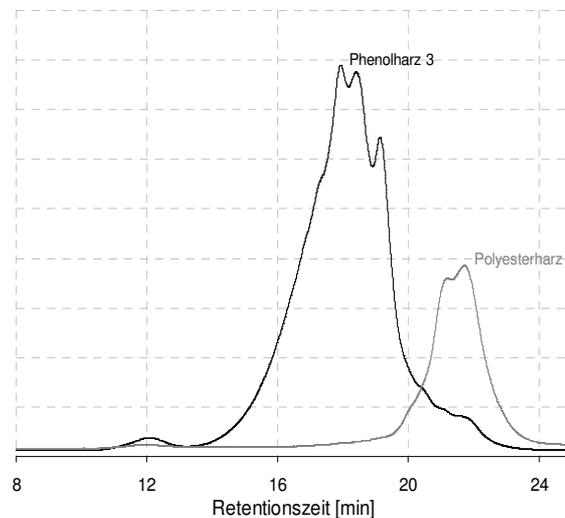


Abb. 3.2: SEC-FLD_{230/300nm} - Chromatogramme des Polyesterharzes und des Phenolharzes 3; chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

Quantifizierung

Zur Quantifizierung der migrierenden phenolischen Verbindungen wurden Migrate mit den Simulanzien H₂O, 3 %iger Essigsäure, 10 %igem Ethanol und 95 %igem Ethanol von drei nicht kommerziellen Polyester-Phenolcoatings hergestellt. Die Polyesterkomponente aller drei Coatings war dabei identisch, nur das basierende Phenolharz variierte.

In Abb. 3.3 sind die Konzentrationen an migrierenden Phenolen in mg/dm^2 für die drei nicht kommerziellen Polyester-Phenolcoatings in den vier Simulanzlösemitteln dargestellt. Wie erwartet haben die unterschiedlichen Polaritäten der Simulanzien auf die Konzentration an migrierenden phenolischen Verbindungen einen Einfluss. Die Quantifizierung erfolgte dabei jeweils über die SEC-FLD_{275/305nm}-Kalibration des im Coating verwendeten Phenolharzes. Bei der Betrachtung jedes einzelnen Coatings migrieren bei der Verwendung der wässrigen Simulanzlösemittel im Gegensatz zum 95 %igem Ethanol weniger phenolische Verbindungen aus der Beschichtung.

Zwischen den drei Polyester-Phenolcoatings sind beim Simulanzlösemittel 95 % Ethanol die Unterschiede am deutlichsten, wobei aus dem Lack des Polyester-Phenolcoatings 3, welches auf veretherten Kresolresols basiert, die größte Menge an Phenolen migriert. Betrachtet man die Grundmonomere Kresol (Polyester-Phenolcoatings 3) und Phenol (Polyester-Phenolcoatings 1 und 2), so ergeben sich durch die zusätzliche Methylgruppe beim Kresol wesentliche Unterschiede im Vergleich zum Phenol bezüglich der Funktionalität und der Reaktivität.

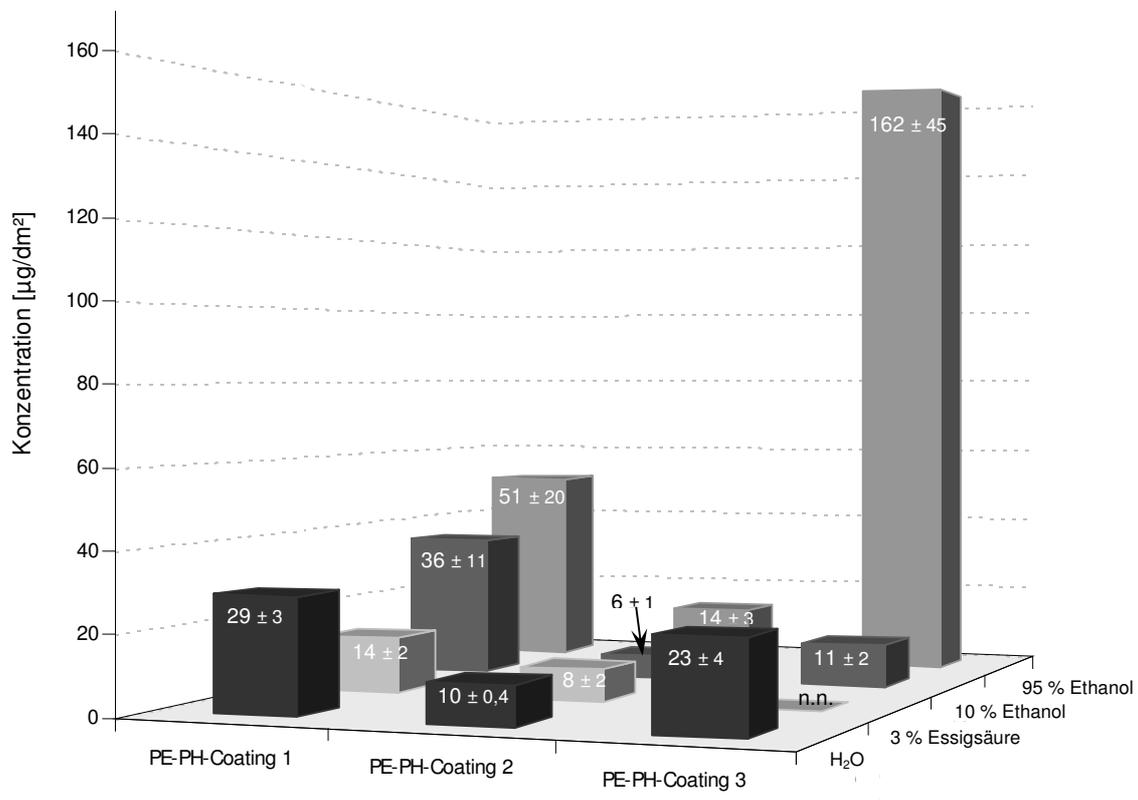


Abb. 3.3: absolute Konzentrationen an migrierenden Phenolen der 3 verschiedenen Polyester-Phenol-Modellcoatings (PE-PH-Coatings) in 4 Simulanzlösemitteln, (MW ± SD, n = 3)

Sowohl die Hydroxylgruppe als auch die Methylgruppe, die beide den Substituenten 1. Ordnung zugeordnet werden, erhöhen die Basizität und somit die Reaktivität des Kernes und dirigieren den zweiten Substituenten vorwiegend in o- und p-Stellung. Die Methylgruppe ist jedoch im Gegensatz zur Hydroxylgruppe in weitaus schwächerem Maß substitutionsfördernd und wirkt sich offenbar nur positiv aus, wenn sie sich in meta-Stellung zur OH-Gruppe befindet und sich somit ihr positiver Einfluss zu dem der phenolischen Hydroxylgruppe addiert.¹⁸ In Tab. 3.1 sind die Funktionalitäten

und die Reaktivitäten der Kresolisomere und von Phenol nach Sprung et al.¹⁴⁷ sowie Haller und Schmidt¹⁴⁸ gegenüber Formaldehyd zusammengestellt.

Tab. 3.1: Funktionalität und Reaktivität der Kresolisomere sowie des Phenols

	trifunktionell		bifunktionell	
Sprung et al. ¹⁴⁷	1,00	2,88	0,35	0,26
Haller/Schmidt ¹⁴⁸	1,00	3,10	1,20	1,80

Zwischen den Werten der beiden Arbeitsgruppen gibt es deutliche Unterschiede, welche auf die verwendeten Reaktionsbedingungen zurückzuführen sind. So haben der verwendete Katalysator sowie das Lösungsmittel großen Einfluss auf die bestimmten Reaktivitäten der einzelnen Phenole. Sprung et al.¹⁴⁷ ermittelten die relativen Reaktivitätsraten in para-Formaldehyd und mit Triethanolamin als Katalysator. Haller und Schmidt¹⁴⁸ verwendeten dagegen als Lösungsmittel Wasser/Methanol mit Formaldehyd und katalysierten die Reaktion mit Natriumhydroxid.

Abhängig von den Reaktionsbedingungen können somit Kresole im Vergleich zum Phenol bezüglich ihrer Funktionalität und Reaktivität z. T. stark reduziert oder aber auch reaktiver sein. Aufgrund der eingeschränkten Funktionalität von o- und p-Kresol werden diese in der Regel jedoch nicht in reiner Form eingesetzt. In der Phenolharzindustrie verwendet man z. B. Kresolharze mit unterschiedlichem Gehalt an m-Kresol. In gleicher Weise, wie die von Sprung et al.¹⁴⁷ bestimmten Reaktivitätszahlen, verhalten sich auch die von Müller et al.¹⁴⁹ unter Verwendung von 30 %igen wässrigen Formaldehyd und Natriumhydroxyd als Katalysator ermittelten Verhältniszahlen für die Verharzungsgeschwindigkeiten (m-Kresol 3,4, Phenol 1,0, p-Kresol 0,6 und o-Kresol 0,4). Sie charakterisieren die Harzbildungsreaktion bzw. den Zeitpunkt des Überganges eines Resols in den Resitolzustand.

Legt man die Daten von Sprung et al.¹⁴⁷ für die absolute Migration in 95 %igen Ethanol (Abb. 3.3) zugrunde, ist anzunehmen, dass das auf veretherter Kresolresol basierende Phenolharzcoating bei gleicher Einbrenndauer und Temperatur langsamer und somit geringer vernetzt, als die auf Phenol basierenden Coatings. Somit liegen mehr niedermolekulare Verbindungen vor, welche während des Migrationsvorganges ins Simulanz übergehen können. Die verminderte Migration an phenolischen Verbindungen bei den auf Phenolharz basierenden Coatings lässt sich auch mit der Funktionalität von Phenol erklären. Durch das Vermögen, dreidimensionale Vernetzungen zu bilden, wird der Eintritt des Lösungsmittels ins Molekülgitter verhindert. Die Löslichkeit des Harzes nimmt somit ab, was sich in der verminderten Migration widerspiegelt.

¹⁴⁷ Sprung, M.M., Reactivity of Phenols Toward Paraformaldehyde, J Am Chem Soc 1941, Vol. 63, No. 2, 334 - 343.

¹⁴⁸ Haller, D.; Schmidt, K.H., Diplomarbeit T.H. Essen, 1983 (zitiert nach ²¹).

¹⁴⁹ Müller, H.F.; Müller, I., Unterschiede im Verhalten von Phenol, Kresol und Xylenol bei der Kondensation mit Formaldehyd, Kunststoffe 1948, Vol. 38. Nr. 11, 221 - 244.

Mit den angegebenen Reaktivitätsraten von Haller und Schmidt¹⁴⁸ sind die ermittelten Migrationsdaten dagegen nicht zu erklären. Bei einer erhöhten Reaktivität der Kresole gegenüber Phenol wäre eine erhöhte Vernetzung und somit eine verringerte Löslichkeit der kresolbasierenden Harze zu erwarten. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den bestimmten Migrationswerten (Abb. 3.3).

Die geringen Unterschiede zwischen den Coatings in den anderen Simulanzien sind vermutlich auf die hohe Polarität der Lösemittel und die damit verbundene geringe Förderung der Migration der eher unpolaren niedermolekularen Oligomeren zurückzuführen.

Molekulargewichtsverteilung

Die Molekulargewichtsverteilung der migrierenden phenolischen Verbindungen ist vor allem vor dem Hintergrund, dass Substanzen mit einer Molmasse von über 1000 Da nur zu etwa 1 % im Gastrointestinaltrakt absorbiert, von Interesse. Entsprechend sollte der Schwerpunkt der Analytik und der toxikologischen Untersuchungen vor allem bei den migrierenden phenolischen Verbindungen unter 1000 Da liegen.

Zur Abschätzung der Molekulargewichtsverteilung von Phenolharzen sowie Migraten aus Polyester-Phenol-Coatings und Epoxy-Phenol-Coatings wurde zunächst eine Molmassenkalibrierung mittels SEC vorgenommen. Dazu wurde das SEC-Chromatogramm in mehrere Zeitfenster eingeteilt, die zeitlich begrenzten Fraktionen gesammelt und mittels RP-HPLC/UVD/ESI-MSD charakterisiert (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Die Molmasse der Peaks mit der größten Absorption im UV-Chromatogramm jeder Fraktion wurde anschließend über die mittlere Retentionszeit des jeweiligen Zeitfensters logarithmisch aufgetragen. Über die durch lineare Regression ermittelte Geradengleichung konnte nun die Retentionszeit der Verbindungen mit einer

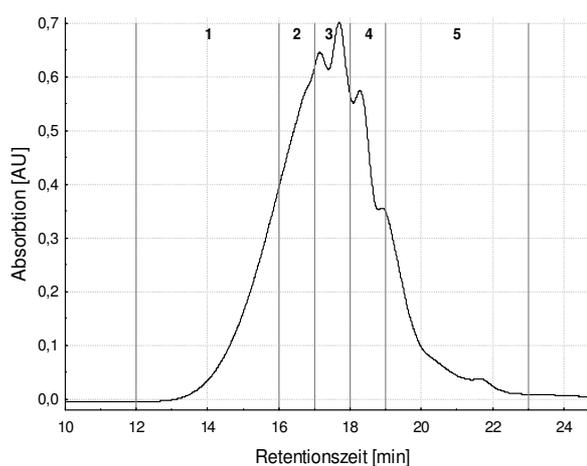


Abb. 3.4: SEC-UVD_{275nm}-Chromatogramm des Phenolharzes 3 mit den zur Fraktionierung verwendeten Zeitfenstern (1 - 5); chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

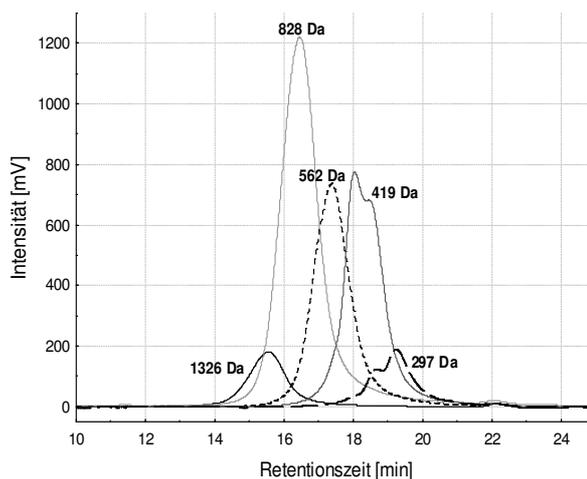


Abb. 3.5: SEC-FLD_{275/305nm}-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen und den darin ermittelten Molmassen der Hauptpeaks; chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

3 Ergebnisse und Diskussion

Molmasse von 1000 Da zu 16,1 min bestimmt werden (Abb. 3.6). Die Elution der Polymere von der SEC-Säule, deren Material auf einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer basiert, wird dabei nicht ausschließlich von der Molekülgröße, sondern auch von dessen strukturellen Eigenschaften, insbesondere dem hydrodynamischen Radius, beeinflusst. So eluieren lineare Verbindungen bei früheren Retentionszeiten als kompakte, cyclische Substanzen, auch wenn sie die gleiche Molmasse besitzen.^{127, 128}

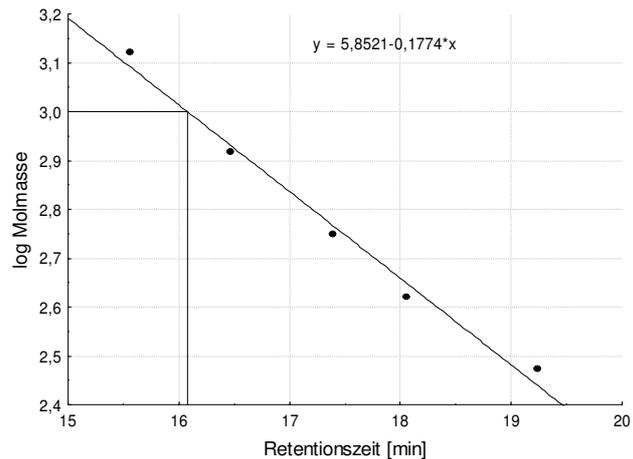


Abb. 3.6: Lineare Regressionsgerade der Molmassen über die Retentionszeit zur Bestimmung der 1000 Da - Grenze

Es wäre somit für jedes zu untersuchende Harz oder Migrat die Bestimmung der Retentionszeit der Verbindungen mit einer Molmasse von 1000 Da notwendig. Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen polymeren Kunststoffen wird dies in der Praxis jedoch nicht durchgeführt. Es werden vielmehr strukturell ähnliche Verbindungen in einzelne Gruppen (z.B. Epoxide, Phenole, Polyester u. a.) zusammengefasst und für diese jeweils die Retentionszeit der 1000 Da - Grenze bestimmt.

Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der migrierenden phenolischen Verbindungen erfolgte beispielhaft anhand des Polyester-Phenol-Modellcoatings 1, dessen Phenolharz den Herstellerangaben zufolge auf einem Phenolresol basiert. Für die Migration mit den bereits unter 2.3.1 aufgeführten Simulanzlösemitteln wurde entsprechend des EU-Würfel-Modells eine Fläche von 6 dm²/l eingesetzt. Im Anschluss an die Migration wurden die einzelnen Migrate für die anschließende SEC-FLD_{275/305nm}-Messung konzentriert.

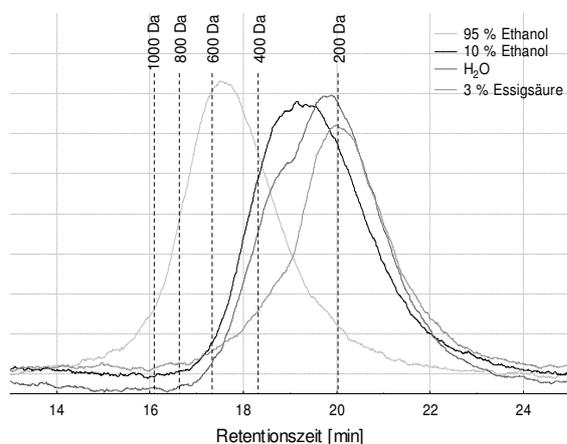


Abb. 3.7: SEC-FLD_{275/305nm}-Chromatogramme der Migrate des Polyester-Phenolcoatings 1 mit unterschiedlichen Simulanzien (Intensitäten normiert); chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

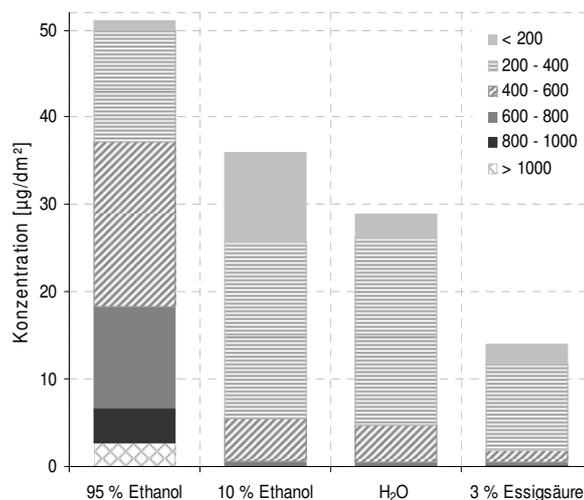


Abb. 3.8: Anteil der Molmassenfraktionen am Gesamtmigrat der jeweiligen Simulanzlösemittel

In Abb. 3.7 sind die SEC-Chromatogramme der Migrante der 4 Simulanzlösemittel dargestellt. Dabei ist deutlich die Verschiebung der migrierenden phenolischen Verbindungen zu höheren Molekulargewichten mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels erkennbar.

Während bei 3 % iger Essigsäure als sehr polares Lösungsmittel das mittlere Molekulargewicht bei etwa 200 Da liegt, weisen die in 95 %igen Ethanol migrierenden Phenole ein um ca. 360 Da höheres mittleres Molekulargewicht auf.

Diese Verschiebung zu höherem Molekulargewicht ist auch sehr deutlich in Abb. 3.8 zu sehen. Hierfür wurden die im SEC-Chromatogramm bestimmten Flächenanteile der jeweils um 200 Da variierenden Fraktionen zwischen 0 bis > 1000 Da auf die jeweils migrierende Konzentration phenolischer Verbindungen übertragen. So ist auch anhand der unterschiedlichen Fraktionen erkennbar, dass im 95 %igen Ethanolmigrat wesentlich höher molekularere Phenole aus dem Coating migrieren. So ist der Gehalt der Verbindungen zwischen 600 und 800 Da in diesem Migrat 20 - 40 mal höher als in den anderen Simulanzien. Im Gegensatz dazu sind in den Migraten mit H₂O und 10 %igem Ethanol die niedermolekularen Verbindungen deutlich stärker vertreten als im 95 %igem Ethanolmigrat. So ist der Gehalt der migrierenden Substanzen mit einer Molmasse zwischen 200 - 400 Da im Vergleich zum 95 %igen Ethanol - Migrat in diesen doppelt so groß. Im Molekulargewichtsbereich unter 200 Da sind die phenolischen Verbindungen dann sogar bereits um das 3 - 10 fache in den wässrigen Simulanzien enthalten.

Betrachtet man nur das Flächenverhältnis der Fraktionen über und unter 1000 Da im SEC-FLD_{275/305nm}-Chromatogramm so ist nur im 95 %igen Ethanol-Migrat ein Anteil an hochmolekularen Verbindungen mit einer Molmasse > 1000 Da mit etwa 6 % enthalten. Auch die Analyse anderer Polyester-Phenol-Modellcoatings ergaben diesbezüglich unter den gewählten Bedingungen ähnliche Ergebnisse.

3.1.2 Identifizierung phenolischer Verbindungen in Phenolharzen

Zur näheren Charakterisierung der Phenolharze sollten die Verbindungen der Hauptpeaks der RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme identifiziert werden. Über Derivatisierungsreaktionen mit Picolinsäure, Essigsäureanhydrid sowie Dansylchlorid wurde dazu die Anzahl an alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen bestimmt. Des Weiteren war vor allem das Wissen um das eingesetzte Phenolmonomer und seine eventuelle Veretherung wichtig. Für die zu untersuchenden Verbindungen wurden vor und nach den Derivatisierungen die Molmassen mittels RP-HPLC-UVD/ESI-MSD ermittelt. Über die Massendifferenzen konnten somit weitere Informationen zu Strukturmerkmalen erhalten werden.

Derivatisierung durch Veresterung mit Picolinsäure nach Mukaiyama

Bei dieser Derivatisierungsmethode wird das nach Mukaiyama benannte Reagenz 1-Methyl-2-Chlorpyridiniumsalz (I) verwendet (Abb. 3.9). Die nucleophile Carbonylgruppe der zur Veresterung eingesetzten Säure, in diesem Fall Picolinsäure (II), substituiert das Chloratom des Mukaiyama-Reagenzes. Die Reaktion erfolgt sehr schnell, da das Chloratom recht leicht gegen ein Nucleophil ausgetauscht wird. Dabei bildet sich ein instabiles Zwischenprodukt, das 2-Acyloxy-1-methylpyridiniumiodid (III), aus welchem anschließend durch den nucleophilen Angriff des Alkohols

(IV) auf die Carbonylgruppe, die neutralen und stabilen Verbindungen 1-Methyl-2-pyridon (VI) sowie das Carbonsäureesterderivat (V) entstehen. Das tertiäre Amin dient während der Reaktion als HCl- bzw. HI-Fänger.¹⁵⁰

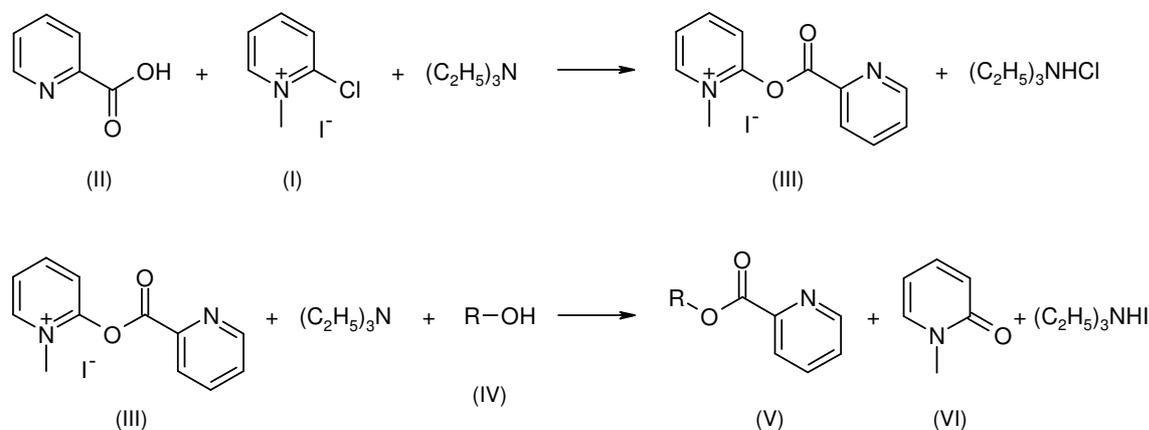


Abb. 3.9: Derivatisierung von Hydroxylgruppen mit Picolinsäure

Für eine erfolgreiche Umsetzung wird in den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Mukaiyama^{151, 152} ein Verhältnis von Säure zum veresternden Alkohol und Kupler von 1:1:1,2 angegeben. Mazón et al.¹⁵³ verwenden dagegen die doppelte molare Menge an Säure. Der Einsatz des Kupplungsreagenzes erfolgt im gleichen molaren Verhältnis zum Alkohol 1:1,2. Als Lösungsmittel für die Reaktion wird Dichlormethan oder Toluol bevorzugt verwendet. Jedoch auch in THF, Acetonitril, Pyridin, Dimethylglycol und Diethylether konnten Saigo et al.¹⁵² zeigen, dass die Umsetzung zum Ester bei der Verwendung von Tributylamin als tertiäres Amin zu 97 - 99 % erfolgt. Bei Versuchen mit unterschiedlichen tertiären Aminen beobachteten sie zudem, dass mit fallender Basizität der Amine die Ausbeute des Esters abnimmt. In der Regel wird Tributyl- oder Triethylamin verwendet. Der Ansatz wird unter Argonatmosphäre über mehrere Stunden und je nach Methode zwischen Raumtemperatur (RT) und 50 °C zur Reaktion gebracht.

Die Optimierung der Derivatisierungsbedingungen für die vorliegende Arbeit erfolgte in Anlehnung an Saigo et al.¹⁵². Das molare Verhältnis der einzusetzenden Reagenzien wurde beibehalten jedoch auf analytische Mengen reduziert. Des Weiteren wurde in Hinblick auf die anschließende HPLC-Chromatographie Acetonitril als Lösungsmittel gewählt und statt Tributylamin Triethylamin als tertiäres Amin eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei einer Temperatur von 100 °C ohne Argonatmosphäre inkubiert. Da diese Anfangsbedingungen möglicherweise aufgrund der oxidativen Atmosphäre zu keinem vollständigen Umsatz des Standards 2-Methylbenzylalkohol (2-MBA) mit Picolinsäure führten, wurde im Folgenden die Reaktionszeit, die Reaktionstemperatur

¹⁵⁰ Mukaiyama, T., Neue Synthesen mit Oniumsalzen von Aza-arenen, Angew Chem 1979, Vol. 91, 798-812.

¹⁵¹ Mukaiyama, T.; Usui, M.; Shimada, E.; Saigo, K., A convenient Method for the Synthesis of Carboxylic Esters, Chem Lett 1975, 1045 - 1048.

¹⁵² Saigo, K.; Usui, M.; Kikuchi, K.; Shimada, E.; Mukaiyama, T., New Method for the Preparation of Carboxylic Esters, Bull chem Soc Jpn 1977, Vol 50, No. 7, 1863 - 1866.

¹⁵³ Mazón, A.; Nájera, C.; Yus, M.; Heumann, A., Kinetic Resolution of Racemic Carboxylic Acids and Alcohols with Homochiral Alcohols and Carboxylic Acids, Respectively, and the Mukaiyama or Palomo Reagents, Tetrahedron: Asymmetry 1992, Vol. 3, No. 11, 1455 - 1466.

sowie der molare Überschuss der Derivatisierungsreagenzien optimiert. Daraus resultierten eine optimale Reaktionstemperatur von 85 °C, eine Reaktionszeit von 4 h sowie ein zehnfacher molarer Überschuss aller Reaktionspartner gegenüber dem eingesetzten Alkohol.

Mit dieser Derivatisierungsmethode werden alle im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen erfasst. Aus den Massenspektren der Derivate lassen sich jedoch auch Hinweise auf eine mögliche Differenzierung ableiten. So konnte eine unterschiedliche Fragmentierung der derivatisierten methyloischen bzw. phenolischen Hydroxylgruppen beobachtet werden. In Abb. 3.10 ist das Massenspektrum des derivatisierten Standards 2,6-Bis-(hydroxymethyl)-p-kresol (BHMpK) dargestellt.

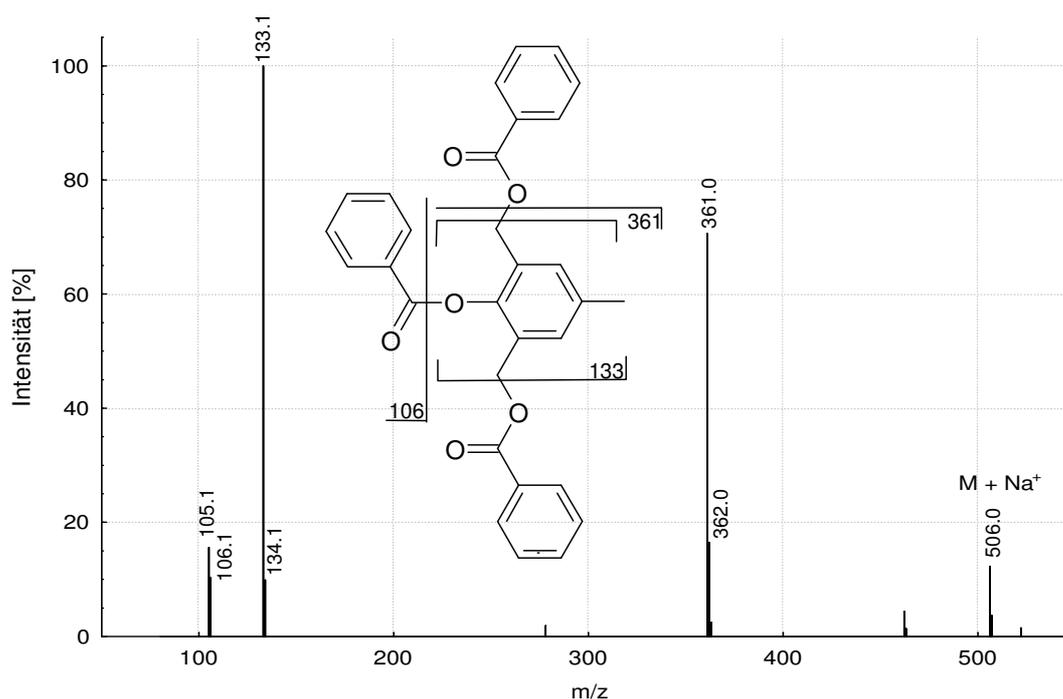


Abb. 3.10: ESI-MSD-Spektrum des mit Picolinsäure derivatisierten BHMpK

Die Spaltung der Esterbindung an den umgesetzten phenolischen OH-Gruppen erfolgt bei der Fragmentierung im ESI-MSD direkt nach dem Carbonylkohlenstoff. Das abgespaltene Fragment besitzt eine Masse von 106 Da. Wird dagegen die Verbindung zwischen der Picolinsäure und einer methyloischen Hydroxylgruppen gespalten, so erfolgt dies erst nach dem Sauerstoff der Esterbindung. Die Masse dieser Abspaltungsgruppe (122 Da) ist jedoch in der Regel nicht als Fragment selbst, sondern nur als Differenz im Massenspektrum zu erkennen (Abb. 3.10).

Durch die Derivatisierung erhöht sich die molare Masse einer Verbindung um 105 Da. Ermittelt man die Differenz zwischen der Molmasse der zu untersuchenden Substanzen vor und nach der Derivatisierung erhält man ein Vielfaches der addierten 105 Da, welches der Anzahl an Hydroxylgruppen im Molekül entspricht.

Auf eine umfangreiche Validierung der Derivatisierungsmethode wurde verzichtet, da die Derivatisierung nur zur Identifizierung, nicht aber zur Quantifizierung genutzt wurde. Im Weiteren

wurde außerdem die Acetylierung als eine weniger aufwendige und langwierige Derivatisierungsmethode zur Bestimmung aller im Molekül enthaltenen Hydroxylgruppen verwendet. Die Methode zur Derivatisierung von Hydroxylgruppen durch Veresterung mit Picolinsäure nach Mukaiyama ist unter Kapitel 5.3.1 zusammengefasst.

Acetylierung

Die Substitution eines reaktiven Wasserstoffatoms mit einer Acetylgruppe wird in vielen Verfahren schon seit längerer Zeit nicht nur zur Bestimmung von Phenolen und Alkoholen, sondern auch von Thiolen und primären und sekundären Aminen genutzt.¹⁵⁴ Ebenso vielfältig wie die Anwendungsmöglichkeiten ist die Auswahl an unterschiedlichen Acetylierungsreagenzien, wodurch ein Einfluss auf die Art an reagierenden Hydroxylgruppen genommen werden kann (Abb. 3.11).^{155, 156} So sind vor allem für sterisch gehinderte, wie z. B. o-tert-butyl-substituierte Phenole stärkere Reagenzien zur vollständigen Acetylierung notwendig.¹⁵⁵



Abb. 3.11: Acetylierungsmittel unterschiedlicher Stärke¹⁵⁶

Bonner et al.¹⁵⁷ beobachteten zudem, dass im Reaktionsansatz mit Essigsäureanhydrid in Tetrachlorkohlenstoff ohne Pyridin als Katalysator kein Phenol reagierte, während Alkohole messbar acetyliert wurden. Dagegen werden bei der Verwendung von Pyridin phenolische im Vergleich zu den alkoholischen Hydroxylgruppen verstärkt acetyliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde Essigsäureanhydrid-Pyridin als Acetylierungsreagenz eingesetzt (Abb. 3.12).

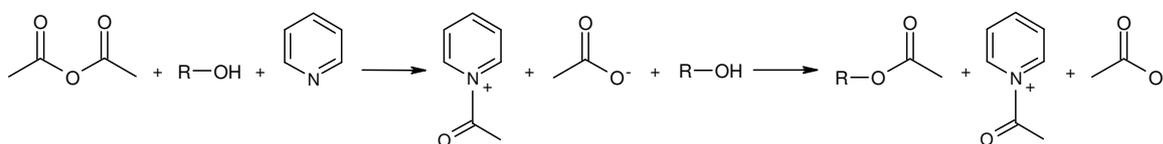


Abb. 3.12: Derivatisierung von Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid

R...Acetyl-, Arylrest

¹⁵⁴ Dewalt, C.W., Jr.; Glenn, R.A., Analytical Acetylation – Application to Coal Hydrogenation Products, Anal Chem 1952, Vol. 24, No. 11, 1789 - 1795.

¹⁵⁵ Schenk, G.H.; Fritz, J.S., Acid-Catalyzed Acetylation, Determination of Phenols, Thiols, Amines, and Mixtures, Anal Chem 1960, Vol. 32, No. 8, 987 - 990.

¹⁵⁶ Monsef-Mirizai, P., Acetylation of phenol derivatives by different methods: relation to coal acetylation, Fuel 1996, Vol. 75, No. 14, 1684 - 1687.

¹⁵⁷ Bonner, T.G.; McNamara, P., The Pyridine-catalysed Acetylation of Phenols and Alcohols by Acetic Anhydride, J Chem Soc (Section) B: Physical Organic 1968, Vol. 7, 795 - 797.

Durch den nucleophilen Angriff des Pyridin-Stickstoffs am Kohlenstoff der Carbonylgruppe des Essigsäureanhydrids entsteht ein N-Acetylpyridiniumion, das als Acetylierungsmittel fungiert. Zugleich entzieht es somit die Essigsäure aus dem Gleichgewicht und sorgt für eine vollständige Acetylierung.

Die Derivatisierung erfolgte in Anlehnung an das von Biedermann und Grob¹⁵⁸ beschriebene Analysenverfahren. Die Arbeitsgruppe um Biedermann und Grob¹⁵⁸ nutzte diese Derivatisierungsmethode zur Acetylierung von alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen in Epoxidlackmigraten. Für die Reaktion (5 min, RT) verwendeten sie je 20 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid.

Als Standardverbindungen zur Überprüfung der Vollständigkeit der Acetylierung sowie deren Linearität über einen bestimmten Konzentrationsbereich, wurde als niedermolekulare Verbindung mit mehreren Hydroxylgruppen BHMpK und als vergleichsweise höhermolekulare Substanz 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol (Bisphenol M, BPM) gewählt (Abb. 3.13).

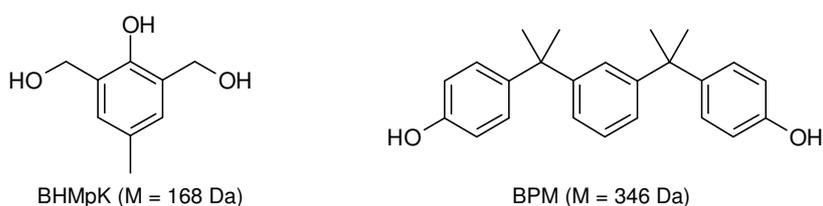


Abb. 3.13: zur Überprüfung der Acetylierung verwendete Standardsubstanzen BHMpK und BPM

Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Derivatisierung wurde zunächst eine RP-HPLC/UVD-Trennung gewählt, wodurch sowohl Edukte als auch Produkte detektiert werden konnten. Abweichend zu den beschriebenen Derivatisierungsbedingungen musste zum Erreichen der vollständigen Acetylierung sowohl die Menge an einzusetzenden Pyridin (50 µl) als auch die von Essigsäureanhydrid (200 µl) etwas erhöht werden. Zudem wurde die Reaktionszeit von 5 min auf 35 min bei RT verändert.

Biedermann und Grob¹⁵⁸ detektierten nach der Acetylierung das Bisphenol-A-diacetal mittels GC-MSD, da es unter den verwendeten Bedingungen zum Verlust der fluorophoren Eigenschaften kommt. Auch bei den verwendeten Standardverbindungen konnte dieser Effekt durch die Veresterung beobachtet werden. Es wurde daher die UV-Detektion bei 220 nm gewählt.

Durch die Derivatisierung verringert sich die Polarität der Substanzen und sie eluieren, im Vergleich zu den underivatisierten Edukten, bei einem wesentlich höheren Anteil an organischem Eluenten. Da in den zu untersuchenden Phenolharzen keine wesentlich polareren Verbindungen als BHMpK zu erwarten waren, wurde der HPLC-Gradient für die Detektion der Derivate, vor allem bezüglich der Ausgangsmischung der Eluenten, an diese Standardsubstanzen angepasst (Abb. 3.14, 5.3.2).

¹⁵⁸ Biedermann, M.; Grob, K., Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC, Food Addit Contam 1998, Vol. 15, No. 5, 609 - 618.

In Abb. 3.15 sind die Kalibrationsgeraden der beiden Standard vor und nach der Derivatisierung dargestellt. Beide verhalten sich im gewählten Konzentrationsbereich linear. Die Nachweisgrenzen der Derivate wurden nach DIN 32645 zu 4,2 mg/l (BHmpK) und 4,5 mg/l (BPM) bestimmt.¹⁵⁹

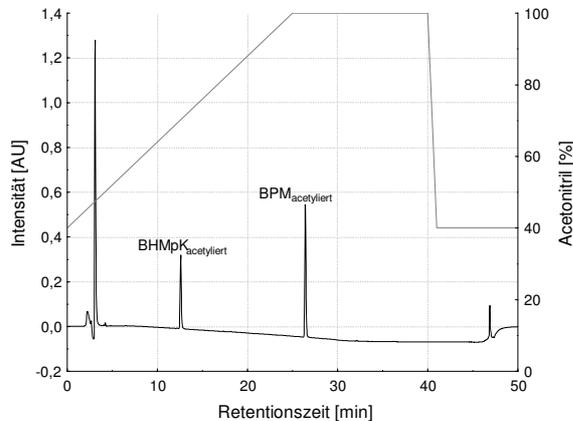


Abb. 3.14: RP-HPLC/UV_{D220nm}-Chromatogramm der acetylierten Verbindungen BHmpK und BPM und für die Derivatisierung optimierter Gradient; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.2

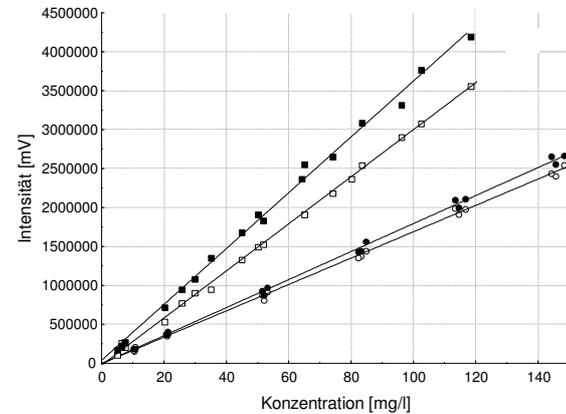


Abb. 3.15: Kalibrationsgeraden der Standards BHmpK (○) und BPM (□) und deren Acetylierungs-Derivate (● BHmpK, ■ BPM)

Durch die Acetylierung einer Hydroxylgruppe erhöht sich das Molekulargewicht der Verbindung um 42 Da. Aus der Differenz der Molmassen vor und nach der Derivatisierung ergibt sich die Anzahl der im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen. Die optimierte Methode zur Derivatisierung von Hydroxylgruppen durch Acetylierung ist unter Kapitel 5.3.2 zusammengefasst.

Vorteil der Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid ist das geringe addierte Molekulargewicht je umgesetzter Hydroxylgruppe, so dass auch bei mehreren Hydroxylgruppen im Molekül kein sehr großer Massenzuwachs erfolgt. Des Weiteren ist das Acetylierungsreagenz mittels Stickstoffstrom aus dem Reaktionsansatz entfernbar, wodurch bei der Analyse keine zusätzlichen Signale außer den Derivaten detektiert werden. Nachteilig dagegen ist, dass im Gegensatz zur Veresterung mit Picolinsäure in den Massenspektren der Produkte keine spezifische Fragmentierung auftritt. Ohne Isolierung der einzelnen Zielsubstanzen vor der Acetylierung ist es somit schwer, die entsprechenden Veresterungsprodukte zu bestimmen. Außerdem werden bei der Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid unspezifisch alle im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen verestert. Man erhält somit durch die Acetylierung lediglich Informationen über die Gesamtanzahl, nicht jedoch über die Art der in einer Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen. In den zu untersuchenden Phenolharzen war es jedoch zu erwarten, dass nebeneinander aliphatische und aromatische Hydroxylgruppen vorliegen. Um eine Aussage über die Anzahl dieser einzelnen Gruppen treffen zu können, wurde als dritte und spezifische Derivatisierungsmethode die Reaktion mit Dansylchlorid gewählt.

¹⁵⁹ DIN 32645, Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze – Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung, DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Mai 1994, Beuth Verlag, Berlin.

Dansylierung

In vielen Analysenverfahren zur Untersuchung von Phenolen und primären und sekundären Aminen hat sich die Reaktion mit Dansylchlorid vor allem wegen der starken fluorophoren Eigenschaft dieses Reagenzes etabliert. Dabei werden in sehr unterschiedlichen Matrices wie z. B. Blut, Urin, Haaren aber auch Medikamenten und Lebensmitteln vor allem Alkaloide, Steroide sowie biogene Amine untersucht.^{160, 161, 162} Die Markierung der zu analysierenden Verbindungen mit dem Fluorophor wird insbesondere genutzt, um die Selektivität und Sensitivität der Detektion der entsprechenden Substanzen zu verbessern.¹⁶³ Die sehr spezifische Emissions- und Extinktionswellenlänge des Dansylchlorids ermöglicht die Vermeidung von Interferenzen mit anderen Verbindungen im Chromatogramm. Dies ist vor allem bei sehr komplexen Matrices von Vorteil. Des Weiteren werden bei der Dansylierung selektiv nur bestimmte Probeninhaltsstoffe erfasst, wodurch das Problem einer möglichen Coelution mit anderen Verbindungen ebenfalls reduziert wird.¹⁶⁴ Während der Derivatisierung reagiert die Sulfonsäuregruppe mit den im leicht basischen Milieu vorliegenden Phenolaten unter Abspaltung von Salzsäure (Abb. 3.16). Die weniger sauren aliphatischen OH-Gruppen bleiben im Gegensatz zu den phenolischen Hydroxylgruppen protoniert und können somit nicht mit Dansylchlorid reagieren.



Abb. 3.16: Derivatisierung phenolischer Hydroxylgruppen mit Dansylchlorid

Die Vorgehensweise bei den in der Literatur publizierten Derivatisierungsbedingungen variieren zum Teil sehr stark. Bei realen Probenmatrices auf wässriger Basis werden zum einen Zwei-Phasen-Dansylierungen unter Einsatz eines Phasen-Transfer-Katalysators (Tetrabutylammoniumsalz) angewendet, zum anderen erfolgt die Extraktion der Zielsubstanzen aber auch schon vor der Derivatisierung.^{165, 166} Dagegen werden die Untersuchungen an Standardsubstanzen überwiegend in aprotischen Medien durchgeführt.¹⁶⁷

¹⁶⁰ Frei, R.W.; Santi, W.; Thomas, M., Liquid chromatography of Dansyl Derivatives of some Alkaloids and the Application to the analysis of Pharmaceuticals, J Chromatogr 1976, Vol. 116, 365 - 377.

¹⁶¹ de Ruite, Otten, R.R.; Brinkman, U.A.T.; Frei, R.W., Rapid and simple dansylation of phenolic steroids using a two-phase system and phase-transfer catalysis, J Chromatogr 1988, Vol. 436, 429 - 436.

¹⁶² Moret, S.; Conte, L.C., High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods – An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics, J Chromatogr A 1996, Vol. 729, 363 - 369.

¹⁶³ Frei, R.W.; Lawrence, J.F., Fluorogenic labelling in high-speed liquid chromatography, J Chromatogr 1973, Vol. 83, 321 - 330.

¹⁶⁴ Naaßner, M., Metabolismus und Verhalten definierter Nonylphenolisomere in Belebtschlamm, Dissertation 2004, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

¹⁶⁵ de Ruite, Otten, R.R.; Brinkman, U.A.T.; Frei, R.W., Rapid and simple dansylation of phenolic steroids using a two-phase system and phase-transfer catalysis, J Chromatogr 1988, Vol. 436, 429 - 436.

¹⁶⁶ Tagliaro, F.; Frigerio, A.; Dorizzi, R.; Lubli, G.; Marigo, M., Liquid chromatography with pre-column dansyl derivatisation and fluorimetric detection applied to the assay of morphine in biological samples, J Chromatogr 1985, Vol. 330, 323 - 331.

¹⁶⁷ Davis, B.A., Dansylation of amines, phenolic and catecholic amines and amino acid in aprotic solvents, J Chromatogr 1978, Vol. 151, 252 - 255.

Die Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode zur Dansylierung von phenolischen Verbindungen aus Phenolharzen erfolgte in Anlehnung an die in der Literatur beschriebene Derivatisierungsmethode von Cassidy et al.¹⁶⁸, in welcher die Analyse von im Urin enthaltenen Hydroxybiphenylen beschrieben wird. Die von Cassidy et al.¹⁶⁸ verwendeten Derivatisierungsbedingungen (Tab. 3.2) wurden zunächst auf die Standardsubstanz p-Kresol angewendet.

Tab. 3.2: Dansylierungsbedingungen nach Cassidy et al.¹⁶⁸

Reaktionsansatz	trockene Probe + 400 µl 0,1 %ige Dansylchloridlösung in Aceton + 30 µl 100 mM Na ₂ CO ₃ -Lösung
Reaktionszeit	15 – 20 min
Reaktionstemperatur	42 – 45 °C
nach Inkubation	+ 2 Tr. 1M NaOH + 500 µl Hexan

Dabei konnte unter den genannten Bedingungen keine vollständige Derivatisierung von p-Kresol erreicht werden. Im Gegensatz zur ursprünglichen Methode nach Cassidy et al.¹⁶⁸, bei der sich nach der Derivatisierung eine Extraktion mit Hexan und die Analyse mittels NP-HPLC anschließt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Probe nach der Derivatisierung unmittelbar der RP-HPLC zugeführt werden. Aus diesem Grund wurde auf die Überführung der Derivate in Hexan verzichtet sowie statt Aceton Acetonitril als Reaktionsmedium gewählt. Eine Verschlechterung der Produktausbeute wurde nach dem Austausch von Aceton gegen Acetonitril nicht festgestellt. Im Folgenden wurde zur Optimierung der Derivatisierung zunächst die Reaktionszeit und -temperatur zwischen 10 - 180 min bzw. RT - 105 °C variiert. Beide Parameter bewirkten jeweils tendenziell mit zunehmenden Werten eine leichte Umsatzsteigerung des Eduktes. Eine vollständige Reaktion des p-Kresols konnte jedoch nicht erreicht werden. Für die weitere Optimierung wurde dennoch die Reaktionstemperatur auf 65 °C und die Reaktionszeit auf 2 h erhöht. Außerdem wurde der Einfluss der molaren Verhältnisse von Dansylchlorid und Na₂CO₃ zum eingesetzten Phenol überprüft. Dabei zeigte sich, dass bei einem 5fachen Überschuss an beiden Reagenzien die Umsetzung des p-Kresols ein Maximum von 80 % durchläuft. Die Erhöhung der Konzentration nur einer der beiden Verbindungen brachte keinen Erfolg. Abschließend wurde der Einfluss des Verhältnisses vom organischen zum wässrigen Lösungsmittelanteil im gesamten Reaktionsansatz auf die Umsetzung des Standards untersucht. Die vollständige Derivatisierung des p-Kresols, im Zusammenhang mit den bereits geänderten Parametern, konnte dabei bei einem Wasseranteil von 20 % im Reaktionsansatz erreicht werden. Dieser Anteil ist dabei vor allem für die Löslichkeit des Na₂CO₃ entscheidend und steht dabei in unmittelbarem Zusammenhang mit dem zur Phenolatbildung notwendigen leicht basischen pH-Wert. Im Gegensatz dazu wirkt sich ein zu hoher Wassergehalt

¹⁶⁸ Cassidy, R.M.; LeGay, D.S.; Frei, R.W., Analysis of phenols by derivatization and high-speed liquid chromatography, J. Chromatogr. Sci. 1974, Vol. 12, 85 - 89.

im Reaktionsansatz negativ auf das Derivatisierungsreagenz aus, welches zunehmend zu seiner korrespondierenden Säure abgebaut wird und somit nicht für die Derivatisierung zur Verfügung steht. Der Wasseranteil in der Derivatisierungslösung ist somit ein Kompromiss zwischen beiden Faktoren.

Bei der anschließenden RP-Chromatographie eluiert das im Reaktionsansatz im Überschuss eingesetzte, stark fluoreszierende Dansylchlorid als breites, intensives Signal deutlich im Zentrum des Chromatogramms. Kwakman et al.¹⁶⁹ entfernten das überschüssige Reagenz durch eine der Dansylierungsreaktion folgenden Festphasenextraktion. Das nicht abreagierte Dansylchlorid wird dabei durch die Reaktion mit den Aminogruppen eines SPE - Materials an dieses gebunden und somit aus der Probe entfernt. Höllrigl-Rosta¹⁷⁰ beseitigte dagegen wie Cassidy et al.¹⁶⁸ den Überschuss an Dansylchlorid mittels Hydrolyse durch die Zugabe von Natronlauge. Des Weiteren wird in der Literatur auch der Einsatz von niedermolekularen Aminen wie Prolin, Butylamin oder Ethylamin beschrieben.^{171, 172, 173} Nachteilig daran ist jedoch, dass der resultierende Derivatpeak des Amins oft als sehr breiter Peak mit starkem Tailing im Bereich der Totzeit im Chromatogramm eluiert. Dabei ist wiederum eine Coelution mit entsprechend polaren Derivaten nicht auszuschließen, wodurch eine Analyse dieser Zielsubstanzen unmöglich wird. Durch die recht geringe Polarität der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Derivate gegenüber den von Kwakman et al.¹⁶⁹ beschriebenen Aminderivaten stellte die Verwendung eines niedermolekularen Amins im vorliegenden Fall kein chromatographisches Problem dar. Es wurde sich deshalb gegen die aufwendige, wenn auch sehr saubere Methode der Festphasenextraktion entschieden und zur Entfernung des Überschusses an Dansylchlorid nach Beendigung der Reaktion Ethanolamin eingesetzt. Die optimierten Reaktionsbedingungen zur Derivatisierung phenolischer Verbindungen sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: optimierte Dansylierungsbedingungen

Reaktionsansatz	Probe + 130 µl Acetonitril + 200 µl 1 %ige Dansylchloridlösung in Acetonitril + 15 µl 1 M Na ₂ CO ₃ -Lösung + 85 µl H ₂ O
Reaktionszeit	2 h
Reaktionstemperatur	65 °C
nach Inkubation	+ 20 µl Ethanolamin + 50 µl Wasser

¹⁶⁹ Kwakman, P.J.M.; Kamminga, D.A.; Brinkman, U.A.Th; de Jong G.J., Sensitive liquid chromatographic determination of alkyl-, nitro- and chlorphenols by precolumn derivatization with dansyl chloride, postcolumn photolysis and peroxyoxalate chemiluminescence detection, J Chromatogr 1991, Vol. 553, 345 - 356.

¹⁷⁰ Höllrigl-Rosta, A., Untersuchung zur Rückstandsdynamik des Azolfungizids Prochloraz in Böden, Dissertation 1999, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.

¹⁷¹ Hawi, A.A.; Yip, H.; Sullivan, T.S.; Digenis G.A., Development of an HPLC Assay for the Analysis of Tetrafluoroptrescine – A Putrescine Analog, Anal Biochem 1988, Vol. 172, 235 - 240.

¹⁷² Schnapp, J., Metallvermittelte Synthese von Peptiden und Cyclopeptiden, Dissertation 2002, Ludwig-Maximilian-Universität München.

¹⁷³ Amiss, T.J.; Tyczkowska, K.L.; Aucoin, D.P., Analysis of taurin in feline plasma and whole blood by liquid chromatography with fluorimetric detection and confirmation by thermospray mass spectrometry, J Chromatogr 1990, Vol. 526, 375 - 382.

3 Ergebnisse und Diskussion

Auch hier wurde der Gradient des HPLC-Systems für die Derivate auf die beiden, bereits bei der Acetylierung vorgestellten Standardverbindungen, BHmpK und BPM, angepasst (Abb. 3.17, 5.3.3). In gleicher Weise wurde außerdem die Linearität der Methode getestet (Abb. 3.18).

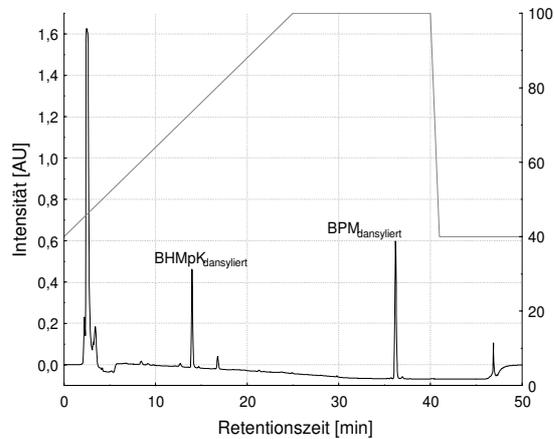


Abb. 3.17: RP-HPLC/UV_{D220nm}-Chromatogramm der dansylierten Verbindungen BHmpK und BPM und für die Derivate optimierter Gradient; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.3

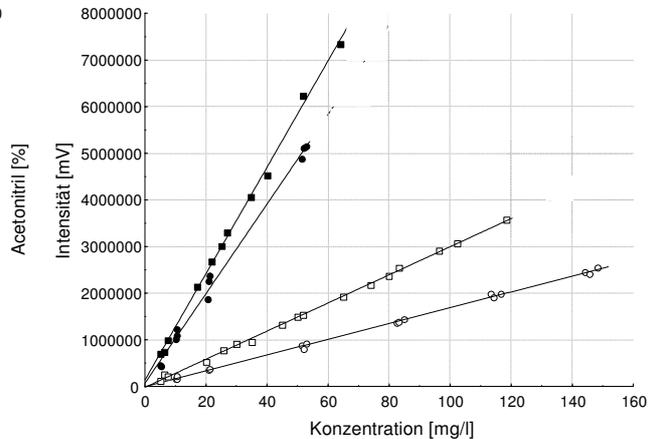


Abb. 3.18: Kalibrationsgeraden der Standards BHmpK (○) und BPM (□) und deren Dansylchlorid-Derivate (● BHmpK, ■ BPM)

Durch die Einführung der stark chromophoren Gruppe des Dansylchlorids ist die UV-Aktivität der Derivate gegenüber den Edukten stark erhöht. Somit war unter den gewählten Bedingungen die lineare Anpassung der Kalibriergeraden der Derivate nur bis 53 mg/l bezüglich des BHmpK sowie 64 mg/l entsprechend für BPM überprüfbar. Die Nachweisgrenzen sind aufgrund der höheren UV-Aktivität geringer als bei der Acetylierung. Für BHmpK liegt die Nachweisgrenze nach DIN 32645 bei 3,29 mg/l, für BPM wurde diese zu 1,94 mg/l bestimmt.¹⁵⁹

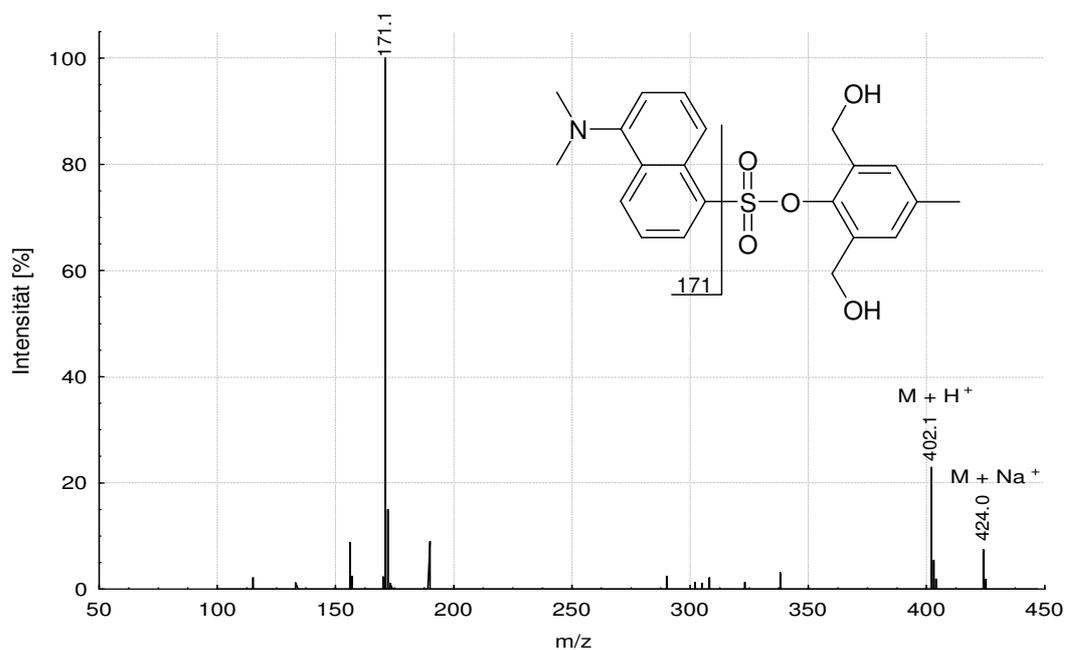


Abb. 3.19: ESI-MSD-Spektrum des dansylierten BHmpK

Im MSD-Spektrum des dansylierten BHMPK ist, wie bei der Derivatisierung mit Picolinsäure, eine charakteristische Fragmentierung des Derivatisierungsreagenzes erkennbar (Abb. 3.19). Das Fragment mit m/z 171 Da kann eindeutig der addierten Dansylgruppe zugeordnet werden. Es ist somit bei einer entsprechenden Fragmentierung möglich, durch verfolgen der Ionenspur von m/z 171 Da im Totalionenchromatogramm selektiv dansylierte Verbindungen zu detektieren.

Durch die Reaktion mit Dansylchlorid erhöht sich das Molekulargewicht um 233 Da. Die Differenz der ermittelten Molmassen ergibt das Vielfache des addierten Dansylchlorids, welches der Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen entspricht.

Die optimierte Methode zur Derivatisierung von phenolischen Hydroxylgruppen durch Dansylierung ist unter Kapitel 5.3.3 zusammengefasst.

Identifizierung einzelner Phenole in Phenolharzen

Untersucht wurden 3 Phenolharze, die entsprechend der Herstellerangaben auf verschiedenen Monomeren basieren.

Zur Identifizierung einzelner phenolischer Verbindungen wurden die Hauptpeaks der RP-HPLC/ULD-Chromatogramme zunächst mittels semipräparativer RP-HPLC/ULD isoliert, die einzelnen Fraktionen konzentriert und anschließend derivatisiert.

a) Phenolharz 1

In Abb. 3.20 ist das Fluoreszenz-Chromatogramm eines Phenolresols (Herstellerangabe) dargestellt.

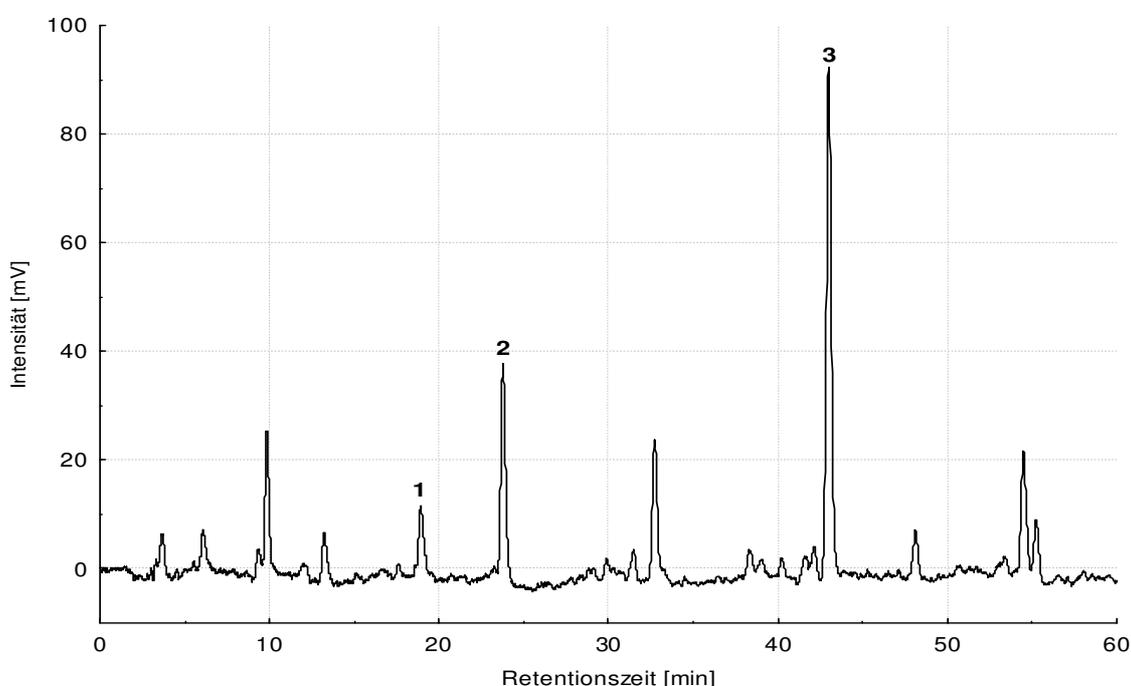


Abb. 3.20: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramm des Phenolharzes 1; für die Peaks 1 - 3 konnten Strukturvorschläge erstellt werden; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Für Peak 1 wurde vor der Derivatisierung eine Molmasse von 296 Da ermittelt. Nach der Derivatisierung mit Picolinsäure wurde für die veresterte Verbindung eine Molmasse von 506 Da detektiert, die Differenz zur underivatisierten Verbindung ergibt sich somit zu 210 Da (= 2fache Derivatisierung mit Picolinsäure). Nach der Dansylierung betrug die Masse 529 Da, woraus ersichtlich ist, dass nur einmal Dansylchlorid addiert wurde (= Differenz 233 Da). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die untersuchte Verbindung eine phenolische und eine methyloische Hydroxylgruppe enthält. Ein möglicher Strukturvorschlag ergibt sich folgendermaßen: Grundlage ist die Molmasse von 296 Da. Bekannt ist außerdem, dass das Grundmonomer ein Phenol (94 Da) ist, an welchem eine freie Methylolegruppe (30 Da) substituiert ist. Die verbleibende Massendifferenz von 172 Da kann zwei mit Butanol veretherten Methylolegruppen zugeordnet werden, die ebenfalls am Phenolkern substituiert sind (Abb. 3.21). Bei der abgebildeten Struktur handelt es sich nur um eines von vielen möglichen Isomeren. Eine genaue Aussage zur Position der Substituten am Phenolring wäre mittels NMR-Spektroskopie möglich.

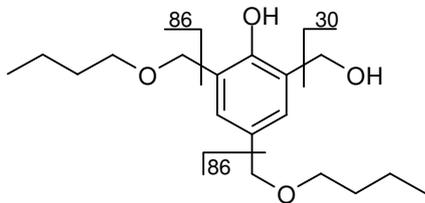


Abb. 3.21. Strukturvorschlag für die Verbindung Peak 1

Für die Verbindungen der Peaks 2 und 3 ergeben sich in gleicher Weise folgende Strukturvorschläge (Abb. 3.22, Abb. 3.23):

Peak 2:

- undervatisierte Verbindung: $M = 402$ Da
- mit Picolinsäure veresterte Verbindung:
 $M = 717$ Da, $\Delta = 315$ Da, entspricht 3 OH-Gruppen
- dansylierte Verbindung: $M = 868$
- $\Delta = 466$ Da, entspricht 2 phenolische OH-Gruppen

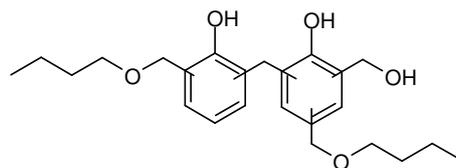


Abb. 3.22: Strukturvorschlag für die Verbindung Peak 2

Peak 3:

- undervatisierte Verbindung: $M = 458$ Da
- mit Picolinsäure veresterte Verbindung:
 $M = 668$ Da, $\Delta = 210$ Da, entspricht 2 OH-Gruppen
- dansylierte Verbindung: $M = 924$
- $\Delta = 466$ Da, entspricht 2 phenolische OH-Gruppen

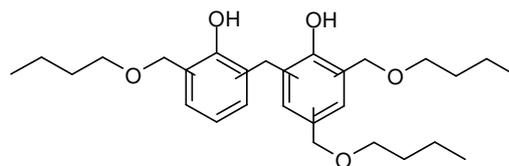


Abb. 3.23: Strukturvorschlag für die Verbindung Peak 3

Während der gesamten Überlegungen zu möglichen Strukturvorschlägen konnten keine sinnvollen Strukturen ermittelt werden, bei denen Phenol mit freien Methylolgruppen Basis ist, wie es vom Hersteller angegeben wird. Nur bei einer vorliegenden Veretherung mit Butanol war es mit den ermittelten Strukturmerkmalen möglich, die oben aufgeführten Strukturvorschläge zu erstellen.

b) Phenolharz 2

Das zweite Phenolharz basiert auf einem veretheren Phenol (Abb. 3.24). Auch hier konnten für mehrere Verbindungen Strukturvorschläge erstellt werden.

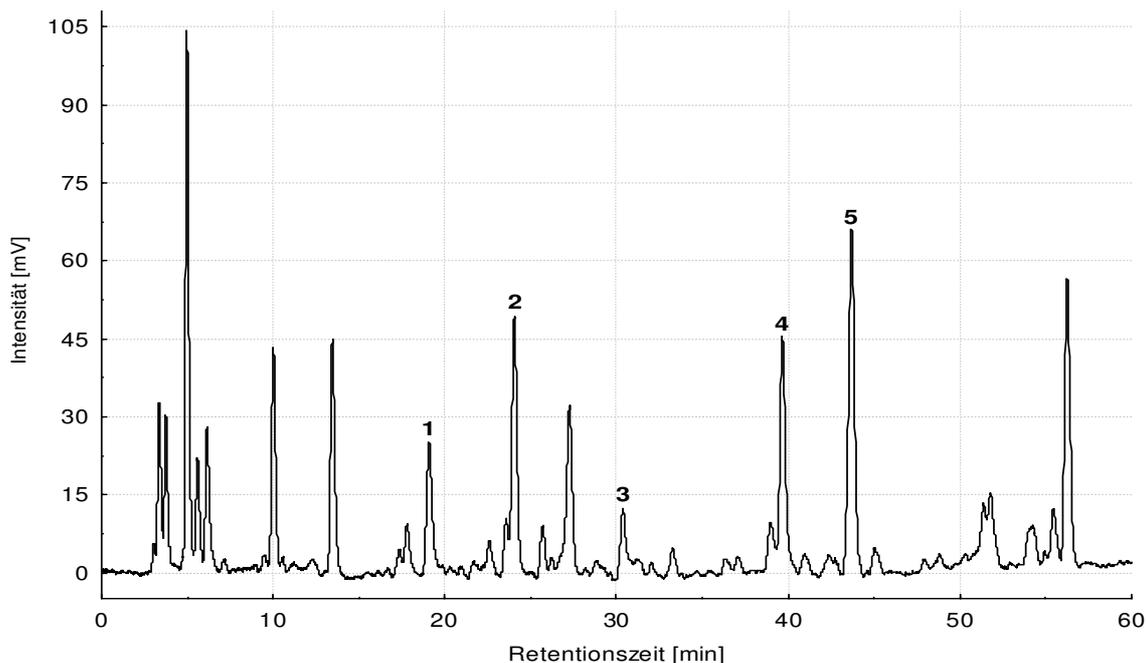


Abb. 3.24: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramm des Phenolharzes 2, für die Peaks 1 - 5 konnten Strukturvorschläge erstellt werden (Abb. 3.25); chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Über die entsprechenden Differenzen der Molmassen vor und nach den Derivatisierungen mit Picolinsäure und Dansylchlorid konnten hier folgende Strukturvorschläge für die im RP-HPLC/FLD-Chromatogramm markierten Peaks erstellt werden (Abb. 3.25).

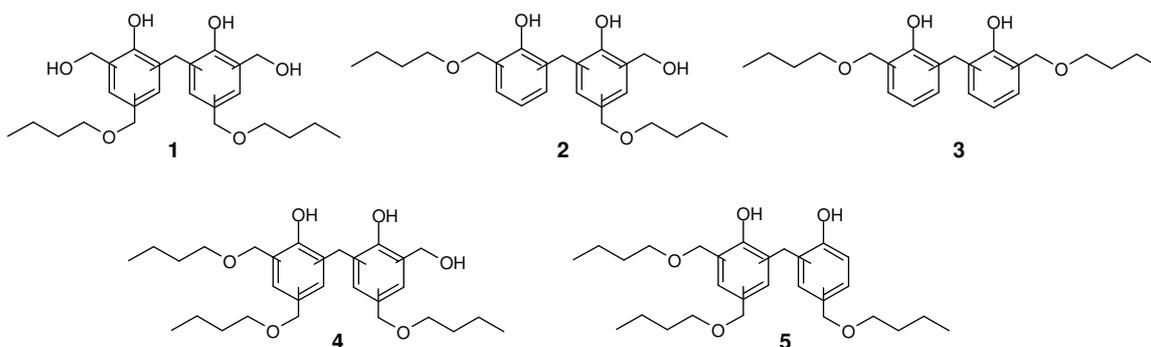


Abb. 3.25: Strukturvorschläge für die im Chromatogramm (Abb. 3.24) markierten Peaks

c) Phenolharz 3

In Abb. 3.26 ist das dritte Phenolharz, welches auf einem veretherten Kresolresol basiert dargestellt. Auch hier konnten für ausgewählte Peaks entsprechende Strukturvorschläge erstellt werden. Dabei wurden bei diesem Phenolharz sowohl die Derivatisierungen mit Picolinsäure als auch mit Essigsäureanhydrid durchgeführt. Beide Methoden lieferten, wie erwartet, die gleichen Ergebnisse.

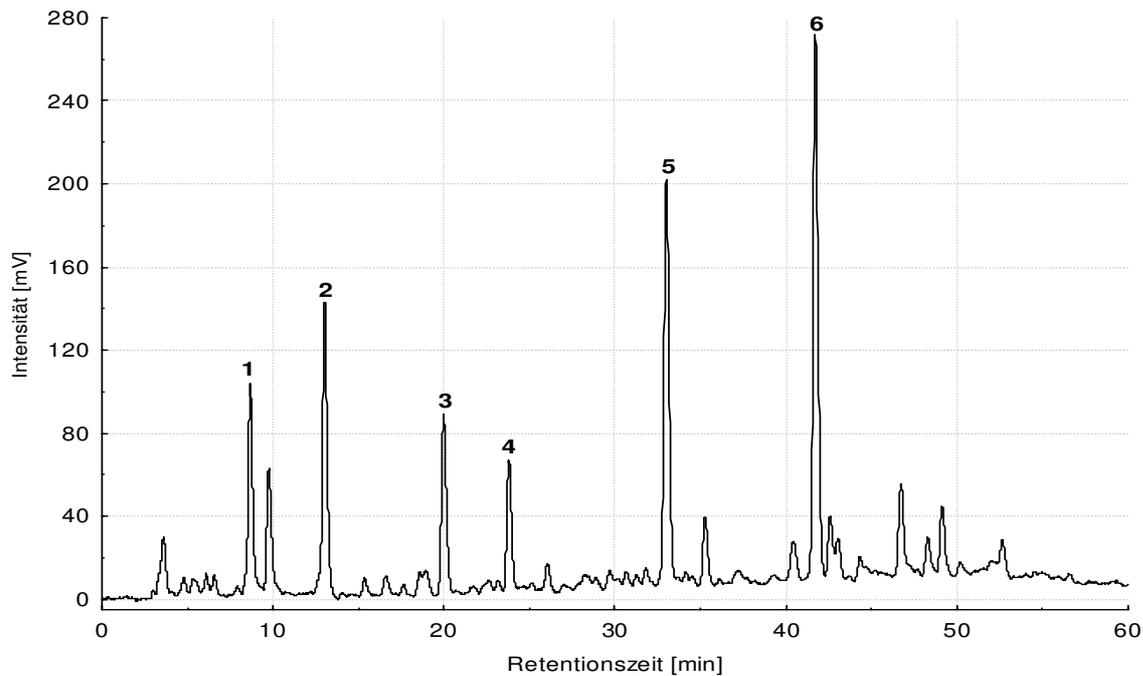


Abb. 3.26: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramm des Phenolharzes 3, für die Peaks 1 - 6 konnten Strukturvorschläge erstellt werden; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

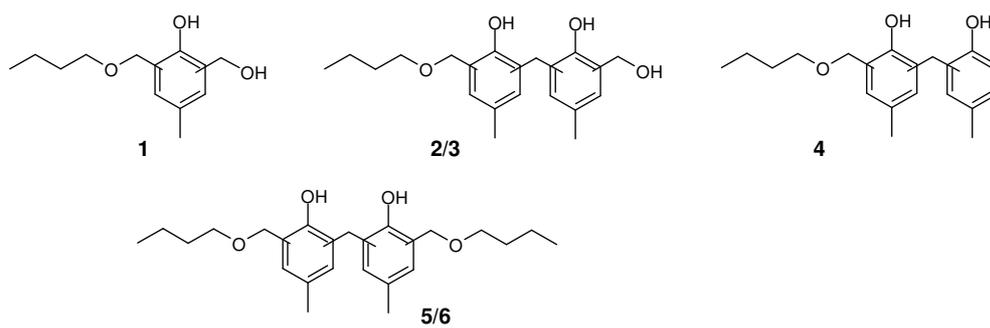


Abb. 3.27: Strukturvorschläge für die im Chromatogramm (Abb. 3.26) markierten Peaks

3.1.3 Vergleich der Zusammensetzung von Harz und Coatingmigrat

Während des Einbrennprozesses kommt es zur Vernetzung der Lackkomponenten und somit zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes. Es war somit von Interesse inwieweit niedermolekulare Harzbestandteile noch nach dem Einbrennprozess im Coating und somit evtl. auch im Migrat zu finden sind. Um dies zu untersuchen, wurden die Chromatogramme des Harzes,

des Coatingmigrates in 95 %igen Ethanol sowie ein Mix der beiden Lösungen bezüglich der Retentionszeiten der eluierenden Peaks verglichen. Auf die Untersuchung des Polyester-Phenol-Modellcoatings 2 wurde verzichtet, da die Konzentration an phenolischen Verbindungen im Migrat sehr gering war (Abb. 3.3). In Abb. 3.28 sind die Chromatogramme von Polyester-Phenol-Modellcoating 1 und dem korrespondierenden Phenolharz sowie ein Mix beider Lösungen dargestellt. Dabei ist in einigen Bereichen eine Übereinstimmung zwischen Harz und Migrat erkennbar.

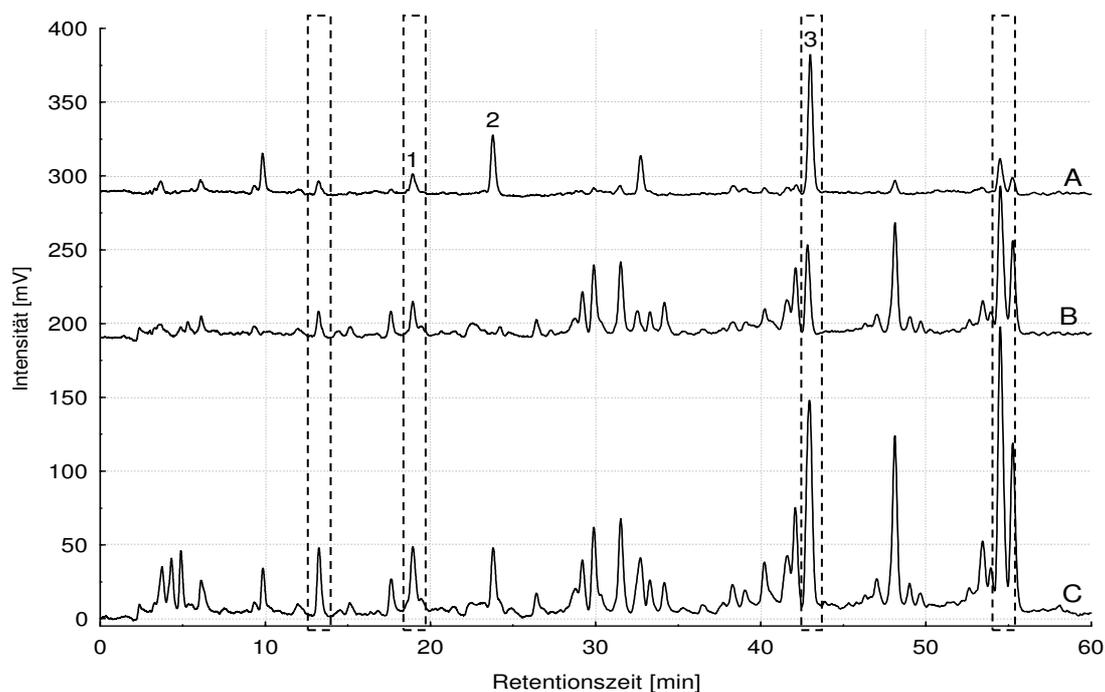


Abb. 3.28: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Polyester-Phenol-Coatingmigrates 1, des korrespondierenden Phenolharzes sowie eines Mixes der beiden Lösungen, A... Harz, B... Migrat, C... Harz + Migrat, Strukturen für die Peaks 1 - 3: Abb. 3.21- Abb. 3.23; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Bei zwei der sowohl im Harz als auch im Migrat detektierten Verbindungen, handelt es sich um im Vorfeld identifizierte Substanzen. Die Reaktivität der im Harz vorliegenden Phenole ist eng mit dem Vorhandensein von methyloischen OH-Gruppen verbunden, über die in erster Linie eine Vernetzung mit anderen Substanzen erfolgt. In Verbindung 3 sind alle methyloischen OH-Gruppen verethert. Ein Einbau in das dreidimensionale Netzwerk bei der Härtung des Harzes, über diese funktionellen Gruppen ist somit nicht mehr möglich. Es ist somit nicht überraschend, dass diese Verbindung unverändert im Migrat zu finden ist. Im Gegensatz dazu besitzt Substanz 1 noch eine freie Methylolgruppe, über die eine Reaktion mit anderen Verbindungen möglich wäre. Strukturell ist somit das Vorliegen im Migrat für diese Substanz nicht erklärbar.

Die Chromatogramme von Polyester-Phenol-Modellcoating 3, dessen korrespondierendem Phenolharz sowie dem Mix beider Lösungen zeigen dagegen keinerlei Übereinstimmungen (Abb. 3.29), so dass bereits allein über den optischen Vergleich der vorliegenden Chromatogramme erkennbar ist, dass die im Harz vorhandenen Phenole während des Einbrennprozesses vollständig umgesetzt bzw. ins Netzwerk eingebaut worden sind. Bei diesem

Basisharz besitzt noch die Hälfte der identifizierten Verbindungen eine reaktive, nicht veretherte methyloische Hydroxylgruppe. Im Gegensatz zum Polyester-Phenol-Modellcoating 1 sind jedoch auch die Substanzen mit vollständig veretherten Methylolgruppen im Migrat nicht zu detektieren.

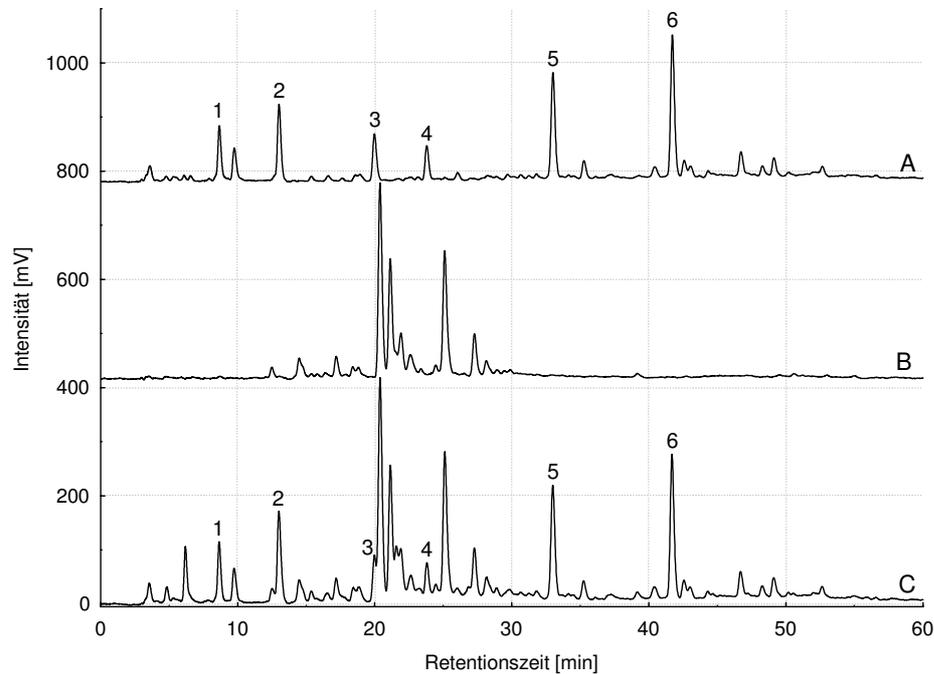


Abb. 3.29: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Polyester-Phenol-Coatingmigrates 3, des korrespondierenden Phenolharzes sowie eines Mixes der beiden Lösungen, A... Harz, B... Migrat, C... Harz + Migrat, Strukturen für die Peaks 1 - 6: Abb. 3.27; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

3.1.4 Charakterisierung von Phenolharzen zur allgemeinen Quantifizierung phenolischer Verbindungen in Migraten

Aufgrund der sehr vielfältigen Phenole, die bei der Harzherstellung als Basisverbindungen verwendet werden können, stellte sich die Frage, inwieweit eine Quantifizierung der migrierenden phenolischen Verbindungen als Summenparameter ohne aufwendige Kalibrierung der einzelnen eingesetzten Ausgangsphenolharze möglich ist. Dazu wurden von mehreren Harzherstellern verschiedene Phenolharze basierend auf unterschiedlichen Phenolen bezogen und mittels SEC-FLD_{275/305nm} kalibriert. Des Weiteren wurde der Anteil unter 1000 Da sowie die Hydroxylzahl und der sich daraus ergebende Gehalt an mmol OH/g bestimmt.

Bei den Harzen handelte es sich um Produkte, die auf folgenden Phenolen basieren: Kresol, verethertes Kresol, verethertes Bisphenol, butyliertes Phenol/Kresol, Kresol/Phenol, Phenol und verethertes Phenol. Insgesamt wurden 17 Phenolharze untersucht, wobei jeweils mindestens 2 mit gleichem Basisonomer zum Vergleich untereinander zur Verfügung standen. Für alle Harze wird von den Herstellern als Einsatzgebiet die Verwendung in Phenol-Epoxidharz-Kombinationen für Innen- und Außenlackierungen von Blechverpackungen in der Nahrungsmittelindustrie angegeben.

Kalibrierung

In Tab. 3.4 sind zwei der verschiedenen für die einzelnen Harze bestimmten charakteristischen Parameter zusammengestellt. Über die Retentionszeit der 1000 Da-Grenze für die SEC-FLD_{275/305nm}-Chromatogramme konnte bestimmt werden, dass alle Harze zu über 80 % aus Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 1000 Da bestehen (Kap. 3.1.1). Die bei der SEC-FLD_{275/305nm}-Kalibrierung der Harze ermittelten Steigungen streuen dagegen sehr stark zwischen Werten von 2,6 und 11,0 mV/(mg/l). Dies entspricht einem Faktor von 4,2 zwischen dem flachstem und dem steilsten Anstieg.

Tab. 3.4: Charakteristische Parameter bestimmt über die SEC-FLD_{275/305nm}-Kalibrierung von auf verschiedenen Monomeren basierenden Phenolharzen bezogen auf die Trockenmasse

Monomer	Harz	< 1000 Da [%]	Steigung *10 ⁶ [mV/(mg/l)]
Kresol	SFC 138 B	84,4	4,4
	PF 9900 LB	81,1	4,4
	SPR 194	88,2	5,5
verethertes Kresol	PF 6806 LB	93,3	7,5
	9989 LB	90,3	6,7
verethertes Bisphenol	FB 210 B 60	91,0	3,3
	PF 0715 LG	94,2	4,0
	PR 401/72B	88,0	11,0
	PR 515/60LG	95,5	5,6
butyliertes Phenol/Kresol	PR 898/52BGB	98,0	6,2
	PR 897/53BG/B	99,5	2,6
Kresol/Phenol	PR 308/62MP	94,8	3,0
	PR 217/65B	97,1	3,9
Phenol	PR 373/53BG/B	100	6,9
	Varkum 2227	95,2	3,8
verethertes Phenol	PF 6535LB	83,4	4,3
	PH 3	87,3	4,0

In Abb. 3.30 sind die Kalibriergeraden der einzelnen Phenolharzgruppen farbig dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es auch innerhalb der gleichen Harztypen keine Übereinstimmung der Steigungen gibt. Parallelitäten bzw. nahezu identische Steigungen zwischen den Geraden sind zufällig und nicht signifikant.

Es ist somit nicht möglich, äquivalent zur Molmassenkalibrierung, strukturell ähnliche Verbindungen über die Kalibrierung eines beliebigen Phenolharzes zu quantifizieren. Bereits Biedermann und Grob¹¹¹ erwähnten die stark variierenden fluorophoren Eigenschaften von Phenolharzen im Zusammenhang mit einer generell anwendbaren Kalibration.

Geht man jedoch davon aus, dass ein zu bestimmendes Migrant auf einem Phenolharz basiert, welches bei einer Kalibrierung im Bereich zwischen den oben dargestellten äußeren Geraden

liegen würde, so ist eine Abschätzung der Menge an migrierenden Verbindungen über diese beiden Kalibriergeraden möglich.

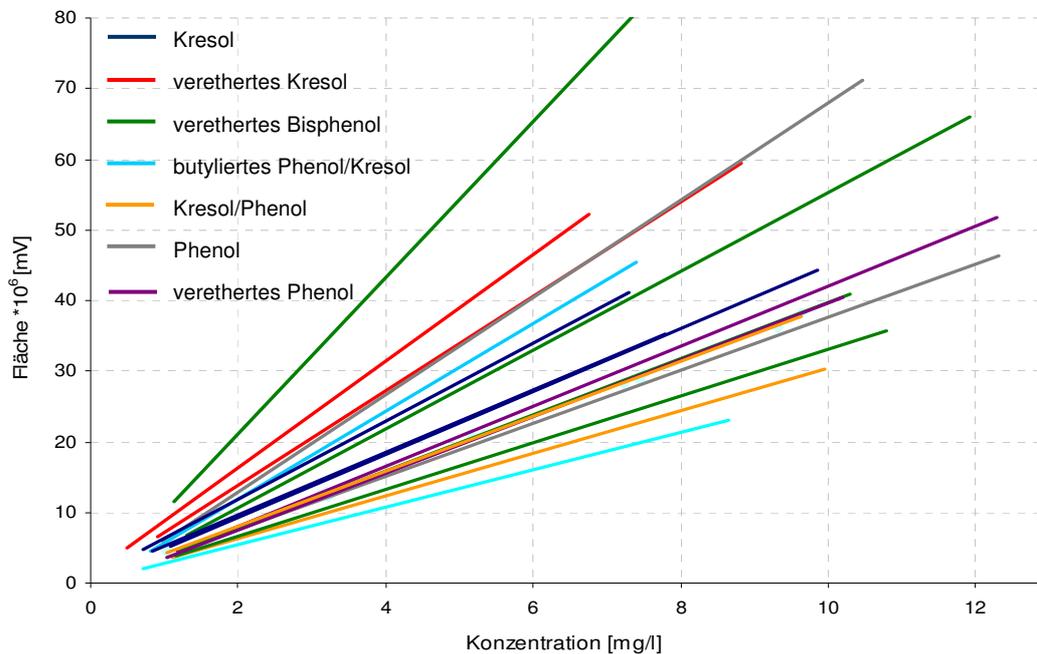


Abb. 3.30: SEC-FLD_{275/305nm}-Kalibriergeraden der in Tab. 3.4 aufgeführten Phenolharzgruppen

So wurde z.B. Polyester-Phenol-Coating 1 (Abb. 3.3) im Simulanz 95 % Ethanol ein Gehalt an migrierenden phenolischen Verbindungen von $(0,057 \pm 0,02)$ mg/dm² bestimmt. Berechnet man den Gehalt über die Kalibriergeraden mit dem größten und kleinsten Anstieg so ergeben sich die Werte 0,02 mg/dm² und 0,081 mg/dm². Übernimmt man diese Gehalte als die Grenzen des Vertrauensbereiches und ihren Mittelwert als den wahren Wert, so ergibt sich eine Konzentration an migrierenden Phenolen von $(0,051 \pm 0,031)$ mg/dm².

In Tab. 3.5 ist die direkt bestimmte Konzentration an migrierenden phenolischen Verbindungen der Modellcoatings (Abb. 3.3) dem, über die in Abb. 3.30 abgebildeten jeweils äußeren Kalibriergeraden, abgeschätzten Gehalt gegenübergestellt.

Die abgeschätzten Gehalte weichen vor allem beim Polyester-Phenol-Coating 3 nicht unerheblich von den direkt bestimmten Werten ab. Diese werden jedoch durch den angenommenen Vertrauensbereich, welcher in diesem Fall kein aus Mittelwert, Standardabweichung sowie statistischer Sicherheit berechneter Wert ist, mit erfasst. Im Allgemeinen sind die Vertrauensbereiche der abgeschätzten Gehalte aufgrund des abzudeckenden Bereiches zwischen den beiden zur Abschätzung verwendeten Kalibriergeraden wesentlich größer. Für eine Abschätzung, in welchen Größenordnungen sich die Konzentration an migrierenden phenolischen Verbindungen bewegt, ist diese Methode jedoch durchaus geeignet.

Tab. 3.5: Vergleich direkt bestimmter und abgeschätzter Gehalte an migrierenden phenolischen Verbindungen

Migrationssimulanz	Phenolharzcoating	direkt bestimmter Gehalt mg/dm ²	abgeschätzter Gehalt mg/dm ²
95 % Ethanol	Polyster-Phenol-Coating 1	0,057 ± 0,02	0,051 ± 0,031
	Polyster-Phenol-Coating 2	0,014 ± 0,003	0,012 ± 0,007
	Polyster-Phenol-Coating 3	0,162 ± 0,045	0,260 ± 0,157
10 % Ethanol	Polyster-Phenol-Coating 1	0,036 ± 0,011	0,032 ± 0,019
	Polyster-Phenol-Coating 2	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,003
	Polyster-Phenol-Coating 3	0,011 ± 0,002	0,019 ± 0,011
3 % Essigsäure	Polyster-Phenol-Coating 1	0,014 ± 0,002	0,012 ± 0,007
	Polyster-Phenol-Coating 2	0,008 ± 0,002	0,007 ± 0,004
	Polyster-Phenol-Coating 3	< BG	< BG
H ₂ O	Polyster-Phenol-Coating 1	0,029 ± 0,003	0,026 ± 0,015
	Polyster-Phenol-Coating 2	0,010 ± 0,001	0,008 ± 0,004
	Polyster-Phenol-Coating 3	0,023 ± 0,004	0,037 ± 0,015

BG...Bestimmungsgrenze

Bestimmung der Hydroxylzahl

Die Bestimmung der Hydroxylzahl erfolgte nach der DIN-Methode 53 240.⁹⁵ Danach wird unter der Hydroxylzahl die Menge an Kaliumhydroxid in mg verstanden, die der Menge an Essigsäure äquivalent ist, welche bei der Acetylierung von 1 g Substanz gebunden wird. Das Prinzip gleicht dem der Acetylierung, welche bereits bei der Identifizierung von Phenolen im Kap. 3.1.2 beschrieben wurde. Auch hier werden alle freien Hydroxylgruppen erfasst. Zur Bestimmung der Hydroxylzahl erfolgt zunächst die Acetylierung in einem Essigsäureanhydrid-Pyridin-Gemisch. Anschließend wird das überschüssige Essigsäureanhydrid mit Wasser hydrolysiert und die entstandene Essigsäure mit Kaliumhydroxydlösung gegen einen Indikator titriert (Abb. 3.31). Abweichend von der DIN-Methode wurde jedoch als Indikator für die Titration anstatt 1 %iger Phenolphthalein-Lösung bzw. 1 %iger Alkaliblauf 6 B-Lösung 0,1 %ige Thymolblau-Lösung verwendet. Grund dafür war der optisch sehr schlecht wahrnehmbare Farbumschlag bei der Verwendung von Phenolphthalein durch die braun-gelbe Grundfarbe der Harze bzw. die Nichtverfügbarkeit von Alkaliblauf 6 B. Der pH-Bereich des Farbumschlages der Thymolblau-Lösung ist mit den pH-Umschlagsbereichen, der in der DIN-Methode vorgeschlagenen Indikatoren vergleichbar.

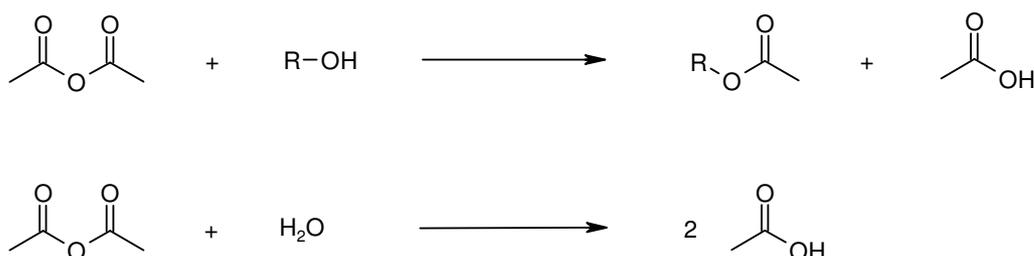


Abb. 3.31: Reaktionsschema der Acetylierung

3 Ergebnisse und Diskussion

Die in der DIN 53 240 zur Auswertung herangezogene Säurezahl wurde nicht berücksichtigt, da diese einen vernachlässigbar kleinen Zahlenwert annahm und somit die Ergebnisse nicht merklich beeinflusste.⁹⁵

Versuche, durch Verwendung von Dansylchlorid anstatt Essigsäureanhydrid nur phenolische Hydroxylgruppen zu erfassen, verliefen erfolglos. Um statistisch sichere Werte zu erhalten, sollten bei der Titration mindestens 75 % des Bindwertes erreicht werden. Dafür darf der Überschuss an Reagenz jedoch maximal das 2fache betragen. Eine vollständige Umsetzung der phenolischen Hydroxylgruppen wird aber nur bei einem hohen Überschuss an Dansylchlorid erreicht. Dies ist darin begründet, dass Dansylchlorid ein gutes Oxidationsmittel ist, d.h. es wird selbst schnell zur äquivalenten Säure reduziert und steht somit nicht mehr für die Reaktion mit phenolischen Hydroxylgruppen zur Verfügung.

Die bestimmten Hydroxylzahlen liegen zwischen 165 – 898. Berechnet man die Anzahl an OH-Gruppen pro Molekül auf das jeweils mittlere Molekulargewicht der einzelnen kalibrierten Harze, so ergeben sich die in Tab. 3.6 dargestellten Werte ((Gl. 3.1), (Gl. 3.2)).

$$mOH = \frac{HZ}{56,1} \quad \begin{array}{l} mOH... \text{ mmol OH/g} \\ HZ... \text{ Hydroxylzahl} \\ 56,1... \text{ Molmasse KOH} \end{array} \quad (Gl. 3.1)$$

$$OH/M = \frac{mOH \cdot MW}{1000} \quad \begin{array}{l} OH/M... \text{ OH-Gruppen/Molekül} \\ mOH... \text{ mmol OH/g} \\ MW... \text{ mittleres Molekulargewicht [g/mol]} \\ 1000... \text{ Umrechnungsfaktor mmol zu mol} \end{array} \quad (Gl. 3.2)$$

Tab. 3.6: Charakterisierung der Phenolharze bezüglich des Molekulargewichts und enthaltener Hydroxylgruppen

Monomer	Harz	Hydroxylzahl ± 5 (HZ)	mmol OH/g (mOH)	mittleres Molekulargewicht [g/mol] (MW)	OH-Gruppen/Molekül (OH/M)
Kresol	SFC 138 B	616	11,0	360	4,0
	PF 9900 LB	898	16,0	240	3,8
	SPR 194	608	10,8	250	2,7
verethertes Kresol	PF 6806 LB	783	14,0	340	4,8
	9989 LB	648	11,2	460	5,2
verethertes Bisphenol	FB 210 B 60	651	11,6	540	6,3
	PF 0715 LG	635	11,3	455	5,1
	PR 401/72B	610	10,9	580	6,3
	PR 515/60LG	287	5,1	360	1,8
butyliertes Phenol/Kresol	PR 898/52BGB	456	8,1	190	1,5
	PR 897/53BG/B	739	13,2	180	2,4
Kresol/Phenol	PR 308/62MP	165	2,9	495	1,4
	PR 217/65B	609	10,9	200	2,2
Phenol	PR 373/53BG/B	671	12,0	180	2,2
	Varkum 2227	427	7,6	420	3,2
verethertes Phenol	PF 6535LB	581	10,4	475	4,9
	PH 3	682	12,2	495	6,0

Die mittleren Molekulargewichte wurden dabei aus den Retentionszeiten des Maximums der SEC-FLD_{275/305nm}-Chromatogramme über die in 3.1.1 ermittelte Molmassenkalibrierung berechnet.

Die Angabe des mittleren Molekulargewichtes über die SEC-Chromatogramme ist jedoch nur eine Abschätzung, da es der Mittelwert des aus der Synthese resultierenden polymerheterologen Gemisches ist. Wie in Abb. 3.32

deutlich wird, kann die molekulare Verteilung trotz nahezu gleichen mittleren Molekulargewichten sehr unterschiedlich sein. Das Kresol/Phenol basierende Phenolharz PR 308/62MP zeigt eine wesentlich schmalere etwa zwischen 50 – 1900 Da liegende Molmassenverteilung, während dessen das veretherte Phenolresol eine deutlich

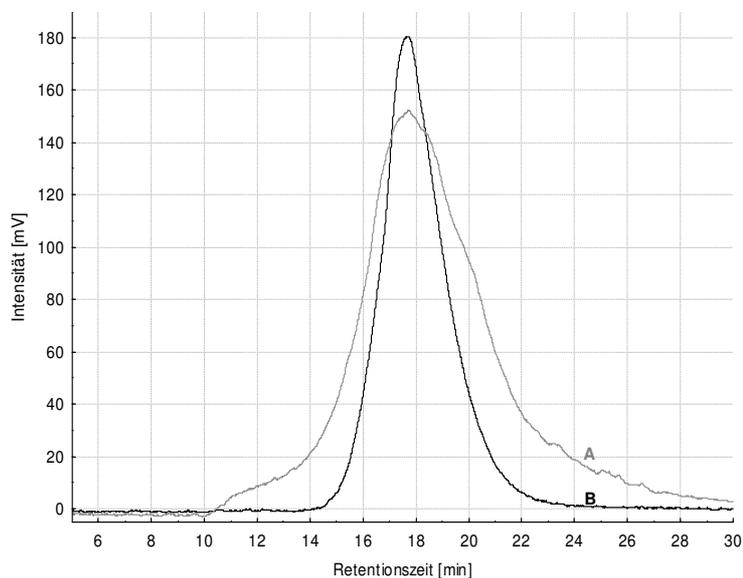


Abb. 3.32: Molekulargewichtsverteilung zweier Phenolharze, **A**...PF6535LB, **B**...PR 308/62MP; chromatographische Bedingungen: isokratisch THF, 1 ml/min bei 20 °C, SDV 100 Å 5µ + SDV 1000 Å 5µ je 8 x 300 mm

breitere ca. zwischen 0 - >> 2000 Da streuende Molmassenverteilung aufweist. Die Breite der Verteilung hängt dabei vom Reaktionsmechanismus der Polymerbildungsreaktion ab. Das mittlere Molekulargewicht wurde jeweils zu 475 (A) bzw. 495 Da (B) bestimmt.

An Hand der in Tab. 3.6 zusammengestellten Werte wird deutlich, dass nicht zwingend das Harz mit der höchsten Hydroxyzahl auch die meisten OH-Gruppen pro Molekül besitzt. Tendenziell steigt die Anzahl der OH-Gruppen im Molekül mit dem mittleren Molekulargewicht (Abb. 3.33).

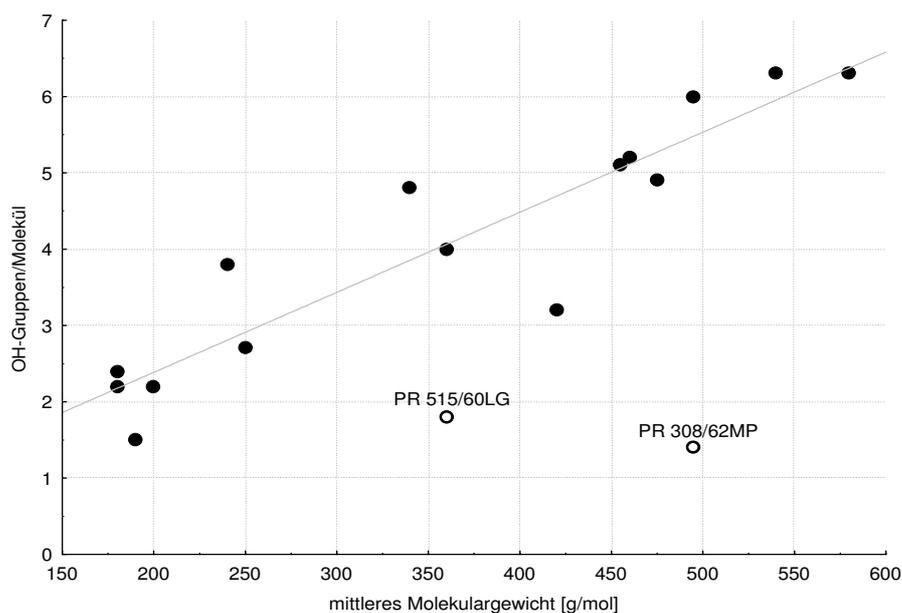


Abb. 3.33: Korrelation zwischen OH-Gruppen/Molekül und dem mittleren Molekulargewicht

Es gibt jedoch auch Ausnahmen, wie das Kresol/Phenol basierende Harz PR 308/62MP, welches ein mittleres Molekulargewicht von 495 g/mol jedoch nur etwa 1,4 OH-Gruppen/Molekül besitzt. Ebenso entspricht das veretherte Bisphenolresol PR 515/60LG (mittleres Molekulargewicht von 360 g/mol, etwa 1,8 OH-Gruppen/Molekül) nicht der allgemeinen Tendenz. Die reduzierte Anzahl an OH-Gruppen/Molekül ist bei diesem Harz möglicherweise auf die Veretherung zurückzuführen.

Beim Kresol/Phenol-Resol RP 308/62MP ist das reduzierte OH-Gruppen/Molekül-Verhältnis allerdings nicht mit der Umsetzung freier OH-Gruppen zu erklären. Neben der Veretherung kann auch ein geringes Phenol-Formaldehyd-Verhältnis bei der Darstellung des Resols Ursache für die geringe Anzahl an freien Hydroxylgruppen im Molekül sein.

Bei allen anderen untersuchten Harzen haben die Herstellungsbedingungen weniger deutlich einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen der Anzahl an OH-Gruppen pro Molekül und dem mittleren Molekulargewicht.

Einen Zusammenhang zwischen den bestimmten Hydroxylzahlen und den Steigungen der SEC-FLD_{275/305nm}-Kalibriergeraden konnte nicht ermittelt werden.

3.1.5 Isolierung phenolischer Verbindungen

Bei der Untersuchung von Phenolen in Harzmischungen oder Migraten aus entsprechenden Beschichtungen (z.B. Polyester-Phenol-Harze bzw. Epoxy-Phenol-Harze) ergibt sich das Problem erneut, dass beide Harzkomponenten UV-aktiv sind und z. T. auch fluorophore Eigenschaften besitzen. Im Fall von Polyester-Phenol-Harzen besteht die Möglichkeit, Phenole neben Polyestern mittels Fluoreszenzdetektion zu bestimmen, da die Fluoreszenzeigenschaften der Polyester im Verhältnis zu den phenolischen Verbindungen vernachlässigbar gering sind (Kap. 3.1.1). Bei einem Chromatogramm eines Epoxy-Phenol-Coatingmigrates ist es dagegen nicht ohne weiteres möglich, zwischen Epoxiden und Phenolen zu unterscheiden, da beide Substanzen sowohl UV-aktiv sind als auch fluorophore Eigenschaften aufweisen. In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, mit denen einzelne bekannte monomere Phenole, BPA und BPF bestimmt werden. Dabei erfolgt die Analyse der Verbindungen hauptsächlich in wässriger Matrix, wie Wasser, Wein und Simulanzlösemitteln nach Abtrennung und/oder Konzentrierung über eine C₁₈-Phase oder mittels Festphasenmikroextraktion unter Ausnutzung der verminderten Polarität der Zielsubstanzen gegenüber anderen in den Lösungen vorliegenden Substanzen.^{122, 174, 175, 176}

In der vorliegenden Arbeit sollten die migrierenden phenolischen Verbindungen im Gegensatz zu den vorliegenden Methoden in 95 %igen Ethanol Migraten kommerzieller Coatings analysiert werden. Dabei galt es alle Phenole unabhängig einer strukturellen Identifizierung zu erfassen. Eine Abtrennung der phenolischen Verbindungen über eine C₁₈-Phase war dabei durch die vergleichbaren Polaritäten der Zielsubstanzen und anderer ebenfalls migrierenden Substanzen, wie Polyester oder Epoxide und der unspezifischen Bindung an dem Festphasenmaterial nicht

¹⁷⁴ Lambert, C.; Larroque, M., Chromatographic Analysis of Water and Wine Samples for Phenolic Compounds Released from Food-Contact Epoxy Resins, *J Chromatogr* 1997, Vol. 35, 57 - 62.

¹⁷⁵ Salafrance, J.; Batlle, R.; Nerín, C., Use of solid-phase microextraction for the analysis of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether in food simulants, *J Chromatogr A* 1999, Vol. 864, 137 - 144.

¹⁷⁶ Biles, J.E.; McNeal, T.P.; Begley, T.H., Determination of Bisphenol A Migrating from Epoxy Can Coatings to Infant Formula Liquid Concentrates, *J Agric Food Chem* 1997, Vol. 45, 4697 - 4700.

anwendbar. Zur Isolierung der Phenole war folglich eine spezifische Abtrennungsmethode notwendig.

Durch die Eigenschaft der Phenole im leicht basischen Milieu Phenolate bilden zu können, bot sich die Verwendung einer Festphasenextraktion an einem Anionenaustauschermaterial an (Abb. 3.34).

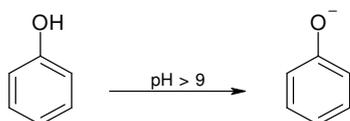


Abb. 3.34: Phenolatbildung im leicht basischen Milieu

Ng et al.¹⁷⁷ verwendeten zur Isolierung von Säuren und Phenolen einen Anionenaustauscher in Form einer Disk (Empore Anion Exchange-SR disk, VWR). Für phenolische Aldehyde erhielten sie dabei nach anschließender Silylierung und gaschromatographischer Trennung in verschiedenen Matrices jedoch stark schwankende Wiederfindungen zwischen 12 und 104 %. Chung et al.¹⁷⁸ setzten bei ihren Untersuchungen von Phenolen einen Anionenaustauscher auf Basis eines Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymers ein und erreichten damit mit wenigen Ausnahmen Wiederfindungen von über 90 %.

Zu Beginn der Methodenentwicklung musste somit zunächst ein geeignetes Anionenaustauschermaterial gewählt werden. Als Festphasenmaterialien standen verschiedene Basismaterialien mit unterschiedlichen Modifizierungen zur Verfügung (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Zur Methodenentwicklung verwendete unterschiedlich modifizierte Anionenaustauscher

Festphasenkartusche	Basismaterial	Modifizierung
<i>J.T.Baker</i> Bakerbond – SPE	Kieselgel	quartanäre Amine Gegenion Cl ⁻
<i>Varian</i> Bond Elut Certify II	Kieselgel	octyl- und quartanäre Amine
<i>Varian</i> SPEC – SAX	Kieselgel	Triethylaminopropylgruppen
<i>Varian</i> Bond Elut PPL	Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer	quartanäre Amine
<i>Marcherey & Nagel</i> PS-OH	Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer	Gegenion Cl ⁻
<i>Dow Chemical</i> DOWEX 1x2, 200 - 400 mesh	Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer	quartanäre Amine 2 % vernetzt
<i>Dow Chemical</i> DOWEX 1x4, 100 - 200 mesh	Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer	quartanäre Amine 4 % vernetzt
<i>Dow Chemical</i> DOWEX Marathon MSA	Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer	makroporös quartanäre Amine Gegenion Cl ⁻

¹⁷⁷ Ng, L.K.; Lafontaine, P.; Harnois, J., Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages – Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation, *J Chromatogr A* 2000, Vol. 873, 29 - 38.

¹⁷⁸ Chung, Y.; Lee, K., Separation and determination of eleven environmental protection agency priority phenols by reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography with indirect fluorophotometric detection and solid phase extraction, *Microchem J* 2001, Vol. 69, 143 - 152.

Es wurden Anionenaustauscher mit entweder Kieselgel oder einem Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer als Basismaterial gewählt. Vorteile von Kieselgelen sind ihre gute mechanische Stabilität und ihre sehr gute Trennleistung. Nachteilig ist jedoch ihre chemische Labilität wodurch sie vorwiegend nur im pH-Bereich zwischen 2 und 7 eingesetzt werden. Bei einem pH-Wert unter 2 kommt es zum allmählichen Kapazitätsverlust. Grund dafür ist die zunehmende Labilität der Bindungen zwischen dem Grundgerüst und den funktionellen Gruppen, wodurch es zum Auswaschen dieser Gruppen kommt. Wird im pH-Bereich über 7 gearbeitet, nimmt die mechanische Stabilität dagegen aufgrund der zunehmenden Löslichkeit des Kieselgels ab.¹⁷⁹

Im Gegensatz dazu können Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymere durch ihrer große chemische Stabilität im gesamten pH-Bereich verwendet werden. Die Porenstruktur dieser organischen Polymerharze ist zudem beeinflussbar über das Verhältnis der beiden Ausgangsstoffe, welches den Grad der Quervernetzung bestimmt. Der prozentuale Gehalt des Harzmaterials an Divinylbenzol (DVB) wird dabei als „Prozent Quervernetzung“ angegeben. In Abhängigkeit des Vernetzungsgrades und der Ionenstärke des verwendeten Lösungsmittels ändert sich das Packungsvolumen einer Festphasenkartusche. Durch die Funktionalisierung des Harzes zum Anionenaustauscher nimmt die Polarität der Teilchen deutlich zu. Polare Lösungsmittel wie Wasser bewirken somit, dass in Abhängigkeit der Zahl der funktionellen Gruppen eine Hydratisierung des Harzes stattfindet. Das damit verbundene Aufquellen des Materials ist um so geringer, je höher der Grad der Vernetzung ist. Unpolare Lösungsmittel wie Acetonitril führen dagegen zur Dehydratisierung wodurch ein Schrumpfungsprozess verursacht wird. Die Quellfähigkeit des Harzes ist wichtig für die funktionellen Gruppen, welche für den Austausch verantwortlich sind, da sie dadurch erst räumlich erreichbar werden.¹⁸⁰

Optimierung der Festphasenextraktion anhand von Standardverbindungen

Da die Abtrennung der phenolischen Verbindungen aus dem Gesamtmigrat hauptsächlich für Epoxy-Phenol-Coatings von Interesse war, wurden zur Methodenentwicklung verschiedene BADGE-Derivate und Phenole als Standardsubstanzen verwendet (Abb. 3.35). BADGE, BADGE (n=1), BADGE (n=2) und BADGE·H₂O dienten dabei in erster Linie der Kontrolle der Stabilität der Oxirangruppen von unterschiedlich hochmolekularen Epoxidverbindungen. Mit BADGE·HCl·H₂O und BADGE·2HCl sollte während der Methodenentwicklung die Beständigkeit der hydrochlorierten Gruppen überprüft werden, da im alkalischen Milieu unter Abgabe von HCl Oxirangruppen entstehen können. BPA und BPM repräsentieren phenolische Verbindungen.

¹⁷⁹ Eith, C.; Kolb, M.; Seubert, A.; Viehweger, H., Praktikum der Ionenchromatographie - Eine Einführung, Metrom-Monographie, Schweiz.

¹⁸⁰ Weiß, J., Ionenchromatographie, zweite, erweiterte Auflage, Weinheim; New York, Basel, Cambridge: VCH 1991.

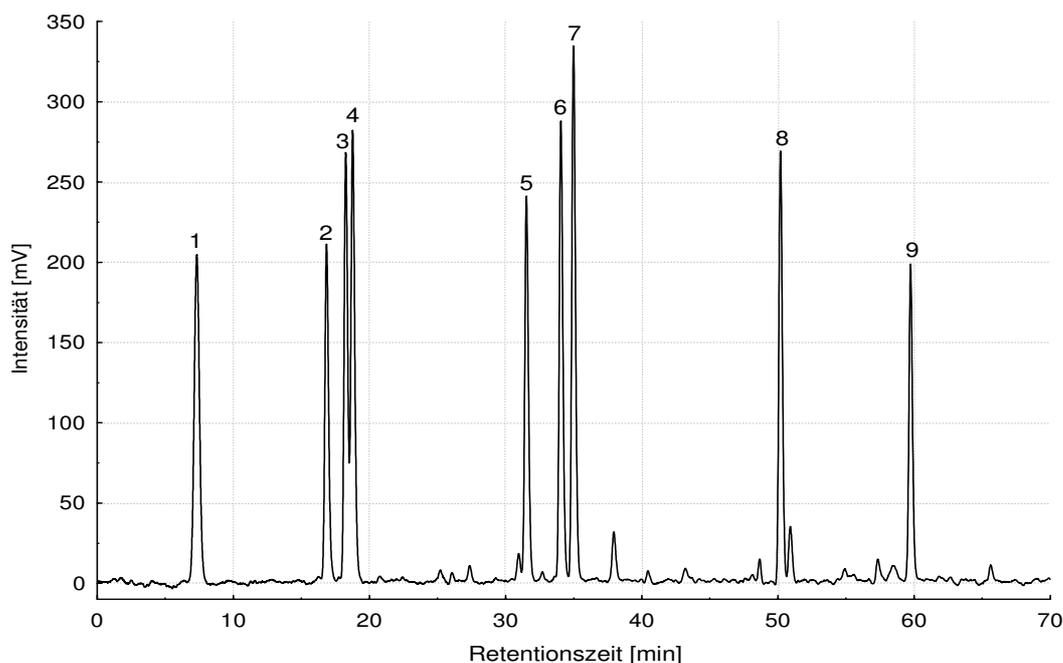


Abb. 3.35: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramm der zur Methodenentwicklung verwendeten Standardsubstanzen; 1...BADGE·2H₂O, 2...BPA, 3...BADGE·H₂O·HCl, 4... BADGE·H₂O, 5...BADGE·2HCl, 6...BADGE, 7...BPM, 8...BADGE(n=1), 9...BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 60 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5μ, 250 x 3 mm

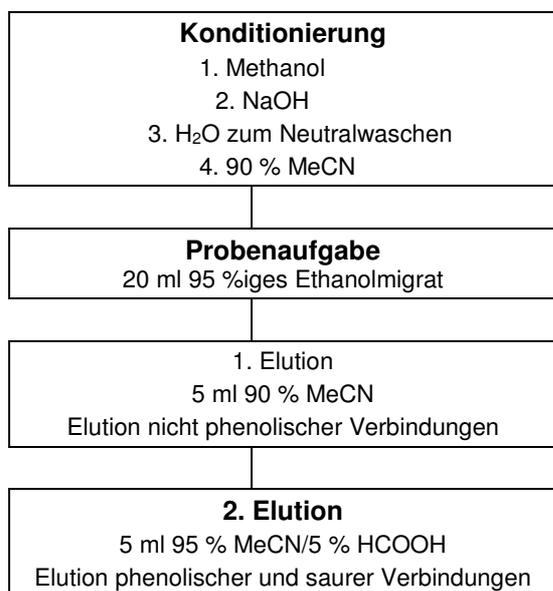


Abb. 3.36: Ablaufschema der Festphasenextraktion

Die Methodenentwicklung der Festphasenextraktion erfolgte entsprechend dem folgenden Ablaufschema (Abb. 3.36).

Bei der Verwendung von NaOH zur Beladung der Festphasenmaterialien mit OH⁻-Ionen konnte mit keinem der oben aufgeführten Anionenaustauscher ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Die Festphasenmaterialien auf Kieselgelbasis zeigten keine Retardierung der phenolischen Verbindungen. Ein Grund dafür kann die bereits oben genannte Labilität des Basismaterials im pH-Bereich der zur Konditionierung verwendeten NaOH-Lösung (pH > 7) sein. Andererseits sind möglicherweise die Wechselwirkungen der aromatischen Phenole mit den aliphatischen funktionellen

Gruppen des nicht über π-Bindungen verfügenden Kieselgels nur sehr schwach oder gar nicht ausgeprägt. Im Gegensatz dazu konnte bei den Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer basierenden Anionenaustauschern mit Ausnahme der verwendeten Kartusche von *Varian* Bond Elut PPL eine gute Bindung der Phenole an die Austauschermaterialien beobachtet werden. Das Austauschermaterial Bond Elut PPL von *Varian* zeigte dagegen das gleiche Ergebnis wie die kieselgelbasierenden Festphasen. Dem positiven Ergebnis bezüglich der Retardierung der

Phenole an den Polystyrol-/Divinylbenzol-Copolymer – Phasen standen jedoch die gleichzeitig unbefriedigenden Resultate bezüglich der BADGE-Derivate gegenüber. So konnten vor allem die hydrolysierten BADGE-Derivate $\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}$ und $\text{BADGE}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ auch im 2. Eluat der Phenole detektiert werden. Die Standardsubstanzen mit intakten Epoxidgruppen bzw. die hydrochlorierten Verbindungen reagieren dagegen fast vollständig während der Festphasenextraktion ab. Dies lässt sich mit dem Bildungsmechanismus von Oxirangruppen und deren Labilität im basischen Milieu erklären. Die hydrochlorierten Verbindungen werden unter Eliminierung von HCl zu Oxiranen umgesetzt, welche anschließend im alkalischen hydrolysiert werden können.

Um die Reaktion der Analyten im basischen Milieu zu vermeiden und außerdem $\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}$ sowie $\text{BADGE}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vollständig abzutrennen, wurden die Gegenionen auf den Austauschermaterialien variiert (Tab. 3.8). Einschließlich der anfänglich verwendeten Natronlauge wurde dabei ein pK_s -Bereich von 2,1 – 24 abgedeckt.

Tab. 3.8: zur Konditionierung verwendete Gegenionen und ihre pK_s -Werte¹⁸¹

	Gegenion	pK_s -Wert
NaOH	OH^-	24
Na_3PO_4	PO_4^{3-}	12,32
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	10,40
$\text{B}(\text{OH})_3$	BO_3^{3-}	9,24
Na_2HPO_4	HPO_4^{2-}	7,21
NaHCO_3	HCO_3^{2-}	6,52
KH_2PO_4	H_2PO_4^-	2,16

Da es sich im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung ergab, dass die kieselgelbasierenden Festphasenmaterialien sowie der Austauscher Bond Elut PPL von *Varian* keinerlei Retardierung der phenolischen Verbindungen zeigten, wurden das Verhalten dieser Kartuschen nicht weiter verfolgt.

In Abb. 3.37 und Abb. 3.38 wird der prozentuale Anteil der Wiederfindungsraten der beiden phenolischen Verbindungen BPA und BPM aus dem Standardmix in den 2 Eluaten der Festphasenextraktion dargestellt. Die Wiederfindungsraten wurden dabei gemittelt, dies war möglich, weil sich beide Standards analog verhalten.

Dabei konnte bei der Verwendung von Na_2HPO_4 sowohl beim makroporösen als auch beim 4fach vernetzten Festphasenmaterial von DOWEX keine Werte für die 2. Elution angegeben werden, da eine entsprechende Auswertung aufgrund von Koelutionen nicht möglich war.

Eventuelle Veränderungen bezüglich der hydrolysierten BADGE-Derivate sowie der verwendeten Epoxidverbindungen werden in den Abbildungen nicht berücksichtigt.

¹⁸¹ Schulze, G.; Simon, J., Jander-Jahr, Maßanalyse – Theorie und Praxis der Titrations mit chemischen und physikalischen Indikatoren, 16. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York 2003.

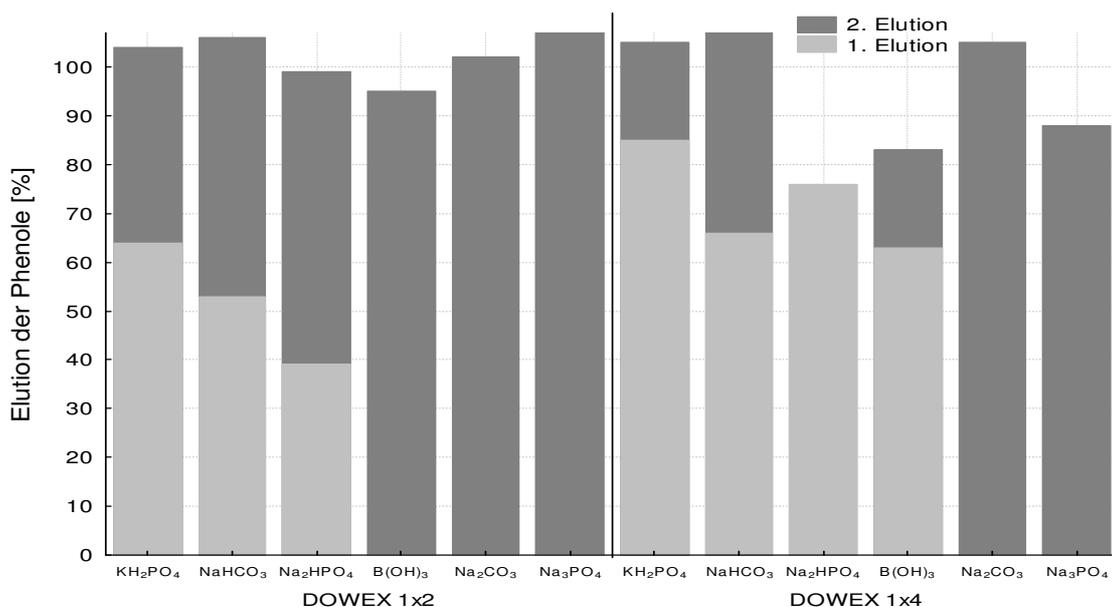


Abb. 3.37: prozentualer Anteil der phenolischen Substanzen BPA und BPM in Summe im 1. und 2. Eluat der SPE in Abhängigkeit der zur Beladung der Kartuschen verwendeten Gegenionen für die Materialien DOWEX 1x2 und DOWEX 1x4

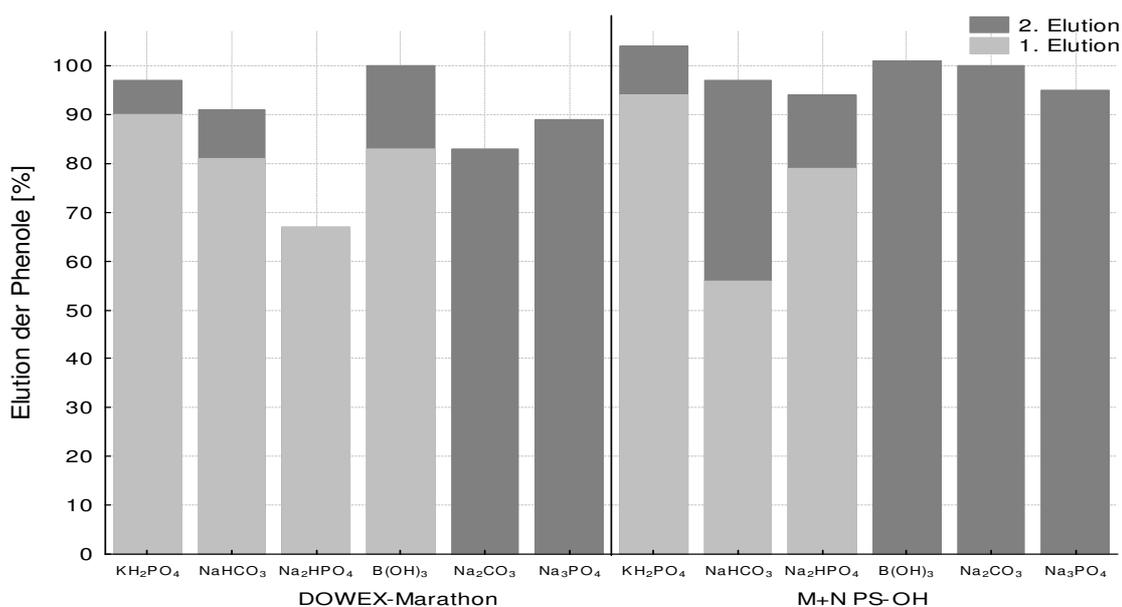


Abb. 3.38: prozentualer Anteil der phenolischen Substanzen BPA und BPM in Summe im 1. und 2. Eluat der SPE in Abhängigkeit der zur Beladung der Kartuschen verwendeten Gegenionen für die Materialien DOWEX-Marathon und M+N PS-OH

Im Allgemeinen ist eine deutliche Tendenz bezüglich der Redardierung der phenolischen Verbindungen mit zunehmendem pK_s -Wert der verwendeten Gegenionen erkennbar. Je kleiner der pK_s -Wert ist, desto geringer ist der prozentuale Anteil der Phenole, der während der SPE auf dem Material zurückgehalten wird. Erst bei der Verwendung von Na_2CO_3 sowie Na_3PO_4 kann bei allen Austauschermaterialien kein Durchbrechen der phenolischen Verbindungen in die 1. Elution mehr beobachtet werden. Die Wiederfindungen sind jedoch mit Werten zwischen 80 - 100 % sehr unterschiedlich.

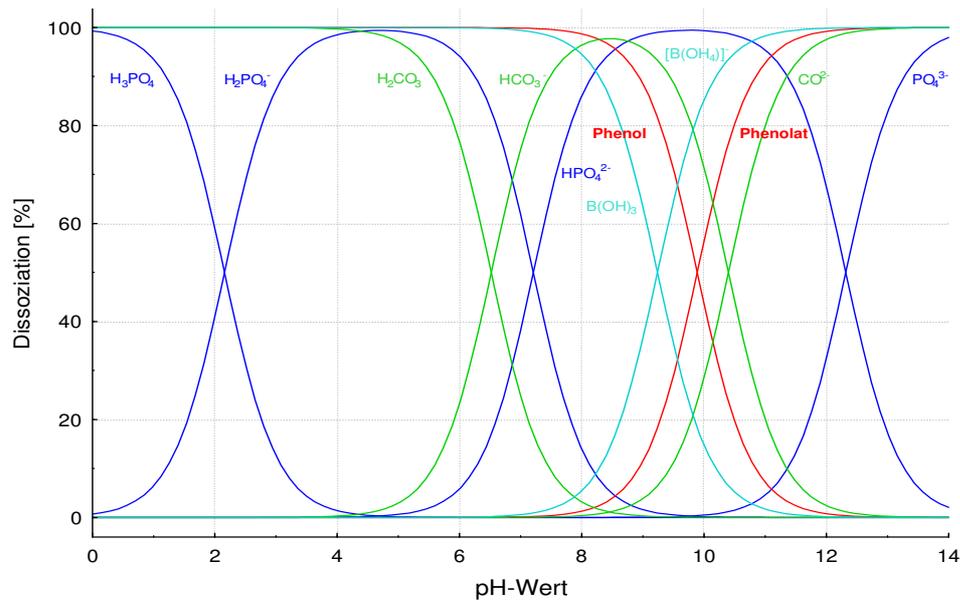


Abb. 3.39: Dissoziationsschemen von Kohlensäure, Phosphorsäure, Borsäure und Phenol

Phenol besitzt einen pK_s-Wert von 9,89.⁴³ Das heißt, bei einem pH-Wert von 9,89 sind 50 % des Phenols dissoziiert (Abb. 3.39). Bei einem pH-Wert von 7,5 ist erst 0,4 % des Phenols dissoziiert.

Bei der Beladung der Festphasen mit Gegenionen, die einen deutlich geringeren pK_s-Wert aufweisen, zeigt sich, dass dieser zur Dissoziation des Phenols und somit zur Bildung von Phenolaten nicht ausreicht. Anhand der Dissoziationsschemen in Abb. 3.39 ist erkennbar, dass Phenol bei der Verwendung von KH_2PO_4 , $NaHCO_3$ sowie Na_2HPO_4 völlig undissoziiert vorliegt.

Die dennoch z. T. recht hohen Wiederfindungsraten (~ 60 %, Dowex 1x2, Na_2HPO_4) der phenolischen Verbindungen im 2. Eluat sind daher weniger auf einen reinen Ionenaustausch-Prozess zurückzuführen. Vielmehr spielen zusätzlich nicht-ionische Wechselwirkungen mit der stationären Phase eine Rolle bei der Retardierung der Phenole. Die größte Bedeutung besitzt dabei die Adsorption, welche sich auf π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringen der Phenole und BADGE-Derivate mit denen des polymeren Grundgerüsts zurückführen läßt.¹⁸⁰

Ng et al.¹⁷⁷ führten die Retardierung der phenolischen Aldehyde in Ihren Untersuchungen sogar hauptsächlich auf diese Interaktionen mit der Styrol-Divinylbenzolmatrix zurück. Bei der Verwendung von $B(OH)_3$ zeigten 50 % der Festphasen eine sehr guten Adsorption der Phenole. Bei den anderen zwei Kartuschen Dowex 1x4 und Dowex Marathon MSA wird maximal ein Viertel der phenolischen Verbindungen am Austauschermaterial adsorbiert. Beim pK_s von $B(OH)_3$ liegen ca. 20 % des Phenols dissoziiert vor. Dies zeigt wiederum, dass die Festphasen doch recht unterschiedliche Eigenschaften im Material aufweisen, was zu der wesentlich geringeren Bindung der Phenole führt. Der Anteil an dissoziiertem Phenol erhöht sich bei der Verwendung von Na_2CO_3 auf 80 %, jedoch erst ab einem pH-Wert von 12 und somit beim pK_s von Na_3PO_4 , liegen 100 % des Phenols dissoziiert vor. Im Vergleich der Festphasen zeigten sich bezüglich der Elution der phenolischen Verbindungen bei der Verwendung von Na_2CO_3 sowie Na_3PO_4 zur Konditionierung keine wesentlichen Unterschiede. Es konnte bei keinem Material ein Durchbrechen der Phenole

bei der 1. Elution beobachtet werden, jedoch waren die Wiederfindungsraten z. T. recht unterschiedlich.

Bezüglich der Dissoziation des Phenols wäre theoretisch auch die Verwendung einer Verbindung mit einem pK_s -Wert von etwa 12 möglich. In den zu untersuchenden Migraten befindet sich jedoch in der Regel kein reines Phenol sondern Oligomere und andere phenolische Verbindungen, die aufgrund von Substituenten etwas andere pK_s -Werte aufweisen. So besitzen bereits die Kresolisomere z.T. deutlich höhere pK_s -Werte (o-Kresol 10,20; m-Kresol 10,01; p-Kresol 10,17). Das heißt, diese Verbindungen liegen somit auch erst bei höheren pH-Werten vollständig dissoziiert vor. Somit erweist sich die Spanne zwischen dem theoretisch notwendigen Wert für Phenol und dem tatsächlichen von Na_3PO_4 , in Hinblick auf die zu untersuchenden Phenolharzmigrante, als notwendig.

Für die eingesetzten BADGE-Derivate ist in Abb. 3.40 am Beispiel von BADGE und $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$ deren Elutionsverhalten auf dem Material PS-OH von *Marcherey & Nagel* bei den unterschiedlichen pK_s -Werten dargestellt. Die Festphasenmaterialien von *Dow Chemical* zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen werden bei der Verwendung von NaOH zur Konditionierung der Materialien weitgehend hydrolysiert. Die hydrochlorierten Derivate sind dagegen bei diesem pH-Milieu weitgehend stabil. Bei den anderen verwendeten Salzen verhalten sich die Epoxidderivate entgegengesetzt. Die chlorierten Substanzen werden unter Abgabe von HCl zu Oxirangruppen umgesetzt, was an der deutlichen Zunahme von BADGE erkennbar ist. Mit abnehmendem pK_s -Wert der Gegenionen steigt ihre Stabilität, erreicht jedoch nicht den Ausgangswert. Während sich somit eine Veränderung des pK_s -Wertes von 24 auf 12,4 bezüglich der epoxidierten Verbindungen positiv auswirkt, kann bei den hydrochlorierten Derivaten bei keinem verwendeten Salz ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden.

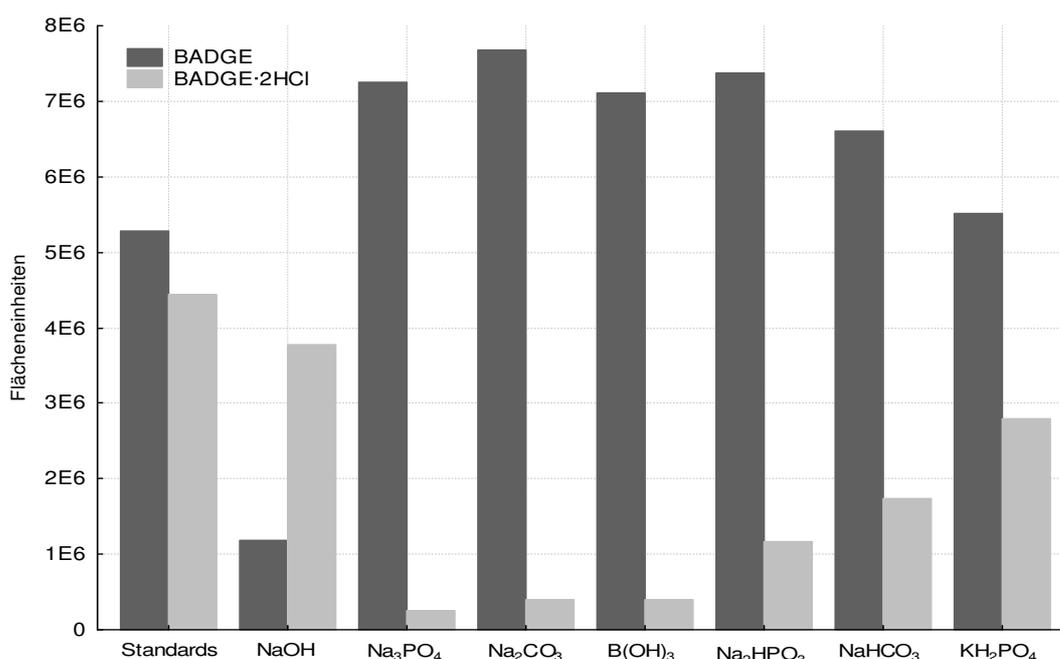


Abb. 3.40: Flächeneinheiten von BADGE und $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$ bei den unterschiedlichen Gegenionen am Beispiel der Festphase PS-OH von *Marcherey & Nagel* im Vergleich zu den eingesetzten Standards

Da jedoch der Abbau der hydrochlorierten BADGE-Derivate zu keinem falsch-positiven Ergebnis führt und das Hauptziel der Methodenentwicklung die Abtrennung der phenolischen Verbindungen von nicht phenolischen Substanzen war, wurde im folgenden Verlauf keine Rücksicht auf die Umsetzung dieser Verbindungen genommen.

Aufgrund der Ergebnisse der einzelnen Festphasenextraktionen wurde für die weitere Arbeit zur Konditionierung des Austauschermaterials Na_3PO_4 gewählt.

Entscheidend bei der Auswahl der Festphasenkartusche war letztendlich das Verhalten des Packungsmaterials während der Extraktion. Das makroporöse Material DOWEX Marathon MSA von *Dow Chemical* besitzt eine sehr große Korngröße ($640 \pm 50 \mu\text{m}$), wodurch die selbstgepackte Kartusche eine geringe Packungsdichte aufwies. Dadurch war das Elutionsvolumen pro min gegenüber den anderen verwendeten Kartuschen vergleichbar hoch. Infolgedessen war zu beobachten, dass bei hoher Elutionsgeschwindigkeit die Zeit für Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Material nicht ausreichend war, um die in Abb. 3.38, mit manueller Reduzierung des Elutionsvolumens erzielten Wiederfindungsraten zu erreichen. Eine reproduzierbare Reduzierung des Elutionsvolumens über die eingesetzte SPE-Vakuumstation war jedoch nicht möglich. Es hätte somit nicht gewährleistet werden können, dass bei mehreren parallel durchgeführten Bestimmungen bei jeder Festphasenextraktion die gleichen Austauschbedingungen vorliegen. Die anderen beiden Materialien von *Dow Chemical* wiesen unterschiedliche Vernetzungsgrade des Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymers von 2 bzw. 4 % auf. Der Vernetzungsgrad bewirkt, wie bereits oben erwähnt eine unterschiedliche Quellung des Materials bei der Verwendung von Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke. Es kommt beim Spülen mit Wasser, nach der Konditionierung mit dem Gegenion, zur starken Quellung des Ionenaustauschermaterials. Dabei verdichtet sich das Packungsmaterial und die Elutionsgeschwindigkeit sinkt. Bei der anschließenden Konditionierung mit Acetonitril und der folgenden Elution entquillt das Material wieder und die Packungsdichte nimmt ab, wodurch das Elutionsvolumen pro min zunimmt. Dadurch traten die gleichen Probleme wie beim makroporösen Material DOWEX Marathon MSA auf.

Bezüglich des Packungsmaterials für die SPE wurde sich deshalb für die kommerziell erhältliche Festphase PS-OH der Firma *Macherey & Nagel* entschieden, bei der keine wesentliche Quellung des Packungsmaterials und somit auch keine Veränderung im Elutionsverhalten zu beobachten war. In Abb. 3.41 sind die Chromatogramme des Standardmixes bei der Aufarbeitung mit dem Festphasenmaterial PS-OH der Firma *Macherey & Nagel* dargestellt.

Die Retardierung der phenolischen Verbindungen (BPA und BPM) erfolgte vollständig, sie eluieren erst im 2. Eluat. Alle anderen Substanzen wurden vom Austauschermaterial nicht zurückgehalten und befinden sich somit im 1. Eluat. Die hydrochlorierten Standards ($\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ und $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$) sind jedoch fast vollständig abgebaut. Durch das basische Milieu kommt es bei diesen BADGE-Derivaten zur Rekonstruktion des Oxiranringes. Dies bestätigt auch die deutlich sichtbare Konzentrationszunahme ihrer korrespondierenden oxirangruppenhaltigen Standards ($\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}$ und BADGE). Im Gegensatz zum pK_s von NaOH ist jedoch der pK_s von Na_3PO_4 nicht ausreichend, um diese epoxidierten Verbindungen zu hydrolysieren.

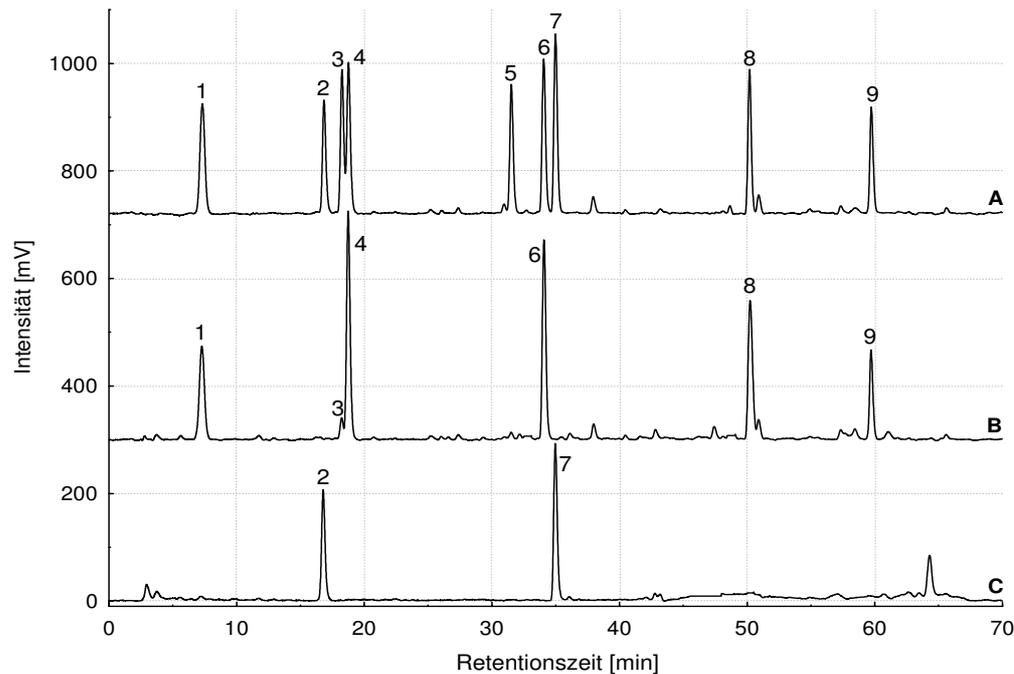


Abb. 3.41: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme zur Trennung der Standardsubstanzen, A...Standardmix vor der SPE, B...1.Elution, C...2. Elution, 1...BADGE·2H₂O, 2...BPA, 3...BADGE·H₂O·HCl, 4... BADGE·H₂O, 5...BADGE·2HCl, 6...BADGE, 7...BPM, 8...BADGE(n=1), 9...BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 60 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Neben dem Einsatz eines anderen Gegenions wurden abweichend vom ursprünglichen Ablaufschema der SPE noch weitere Konditionierungsschritte vor der Probenaufgabe eingeführt. Damit sollte eine mögliche Verunreinigung der Eluate durch Bestandteile des Festphasenmaterials minimiert werden. Außerdem wurde das 90 %ige Acetonitril als letzter Konditionierungsschritt vor der Probenaufgabe gegen 95 %igen EtOH ausgetauscht. Das Kartuschenmaterial befindet sich somit in dem Lösungsmittel, in dem auch die Probe aufgegeben wird. Als weitere Änderung gegenüber der ursprünglichen Vorgehensweise erfolgt die Elution der nichtsauren und nichtphenolischen Verbindungen anstatt mit 90 %igem Acetonitril mit reinem Acetonitril. In Abb. 3.42 sind die optimierten Konditionierungsbedingungen aufgeführt. Die ausführliche Methode zur Isolierung von phenolischen Verbindungen aus Migraten ist unter Kapitel 5.3.4 zusammengefasst.

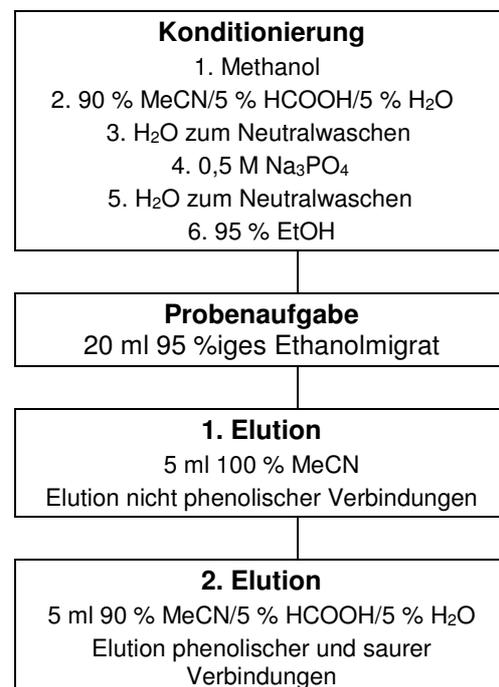


Abb. 3.42: optimierte Konditionierungsbedingungen für die SPE

Anwendung der SPE auf Harze und Epoxy-Phenolcoating-Migrate

Im Anschluss an die Optimierung der Festphasenextraktion anhand von Standardverbindungen wurde die Methode auf einen Mix aus dem vorliegenden Phenolharz 3 und einem Bisphenol A basierendem Epoxidharz (Nr. 1) übertragen.

Zur Kontrolle der SPE wurden zunächst die einzelnen Harze sowie die Mischung chromatographiert. In der Abb. 3.43 ist im Chromatogramm A die Mischung des Epoxid- mit dem Phenolharz vor der SPE dargestellt. Chromatogramm B entspricht dem Epoxidharz 1 ebenfalls vor der SPE. Vergleicht man dieses mit Chromatogramm C, welches die Verbindungen der 1. Elution, also die nichtphenolischen und nichtsauren Substanzen, enthält, ist mit Ausnahme des Peaks bei einer Retentionszeit von 28 min, kein Unterschied im Peakmuster zu erkennen. Das Chromatogramm des Phenolharzes vor der SPE ist mit D gekennzeichnet. Auch beim 2. Eluat (Chromatogramm E) kann man im Vergleich zum Ausgangsharz, abgesehen vom Peak bei 28 min und im Bereich des Totvolumens, keine Unterschiede im Peakmuster erkennen. Bei der Verbindung mit einer Retentionszeit von 28 min handelt es sich um eine Substanz aus dem Phenolharz, die jedoch entsprechend ihrem Verhalten bei der SPE keine phenolische Hydroxylgruppe enthält und deshalb im 1. Eluat auftritt. Insgesamt war die Anwendung der optimierten SPE-Bedingungen auf eine Mischung aus einem Epoxid- und Phenolharz ohne weitere Optimierungsschritte erfolgreich.

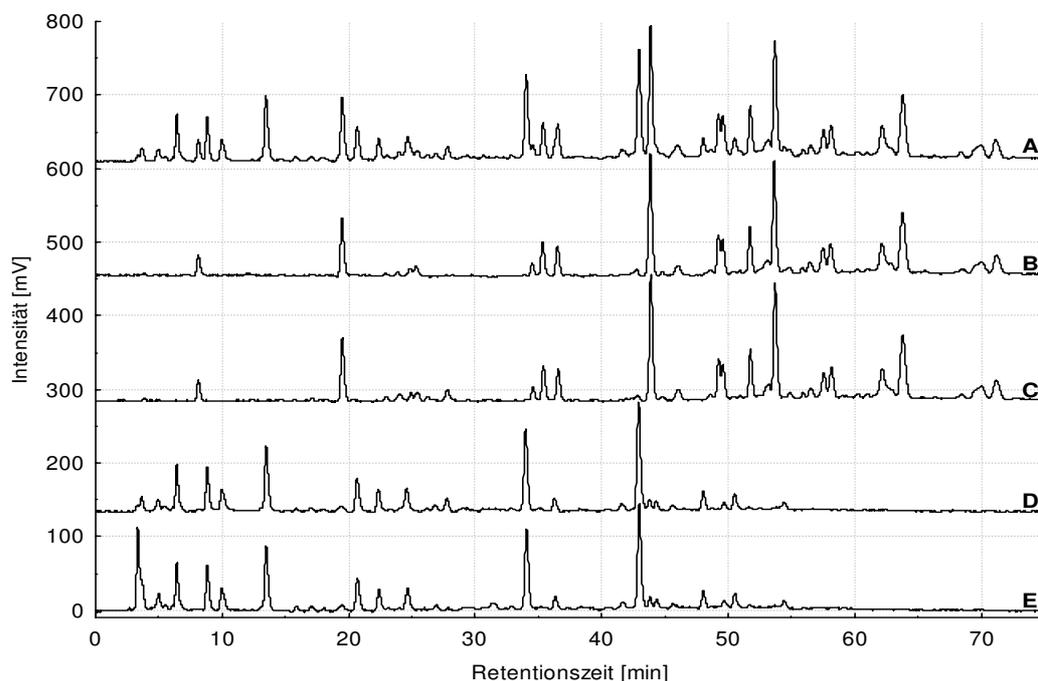


Abb. 3.43: Vergleich der RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme einer Epoxid-Phenolharz-Mischung vor und nach der Festphasenextraktion sowie ungemischt, A...Epoxid-Phenolharz-Mischung vor der SPE; B...Epoxidharz 1 vor der SPE; C...1. Eluat; D...Phenolharz 3 vor der SPE; E...2. Eluat; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Abschließend sollten Migrate von kommerziellen Coatings untersucht werden. Es wurden dafür zwei Epoxy-Phenol- sowie ein Polyester-Phenol-Coating verwendet.

Zunächst erfolgte jeweils die Herstellung von 95 %igen Ethanolmigraten, wobei 2 dm² in 50 ml eingesetzt wurden. Bereits die Migrat zeigen eine leichte Gelbfärbung, welche auf das Vorhandensein von Phenolen hindeutete. Bei der anschließenden SPE konnte dann eine deutliche Akkumulierung der Phenole auf dem Festphasenmaterial in Form einer gelben bis bräunlichen Bande beobachtet werden (Abb. 3.44).

Bei der anschließenden Elution erhält man ein klares ungefärbtes erstes Eluat. Durch die Ameisensäure des 2. Elutionsmittels werden die Phenole und sauren Verbindungen vom Material gelöst, die gelbliche Bande eluiert. Das zweite Eluat besitzt, resultierend daraus eine deutliche gelbe Färbung. In Abb. 3.45 ist die Anwendung der Methode auf das Epoxid-Phenol-Coating 1 dargestellt. Dabei sind kaum Unterschiede zwischen der 1. und 2. Elution zu erkennen. Der Gehalt an migrierenden phenolischen Verbindungen ist gering. In vielen Bereichen scheinen phenolische und nichtphenolische Verbindungen zu coeluiieren. Der Flächenanteil der 2. Elution am Gesamtmigrat beträgt nur etwa 10 %.



Abb. 3.44: Akkumulierung von Phenolen auf der SPE-Kartusche

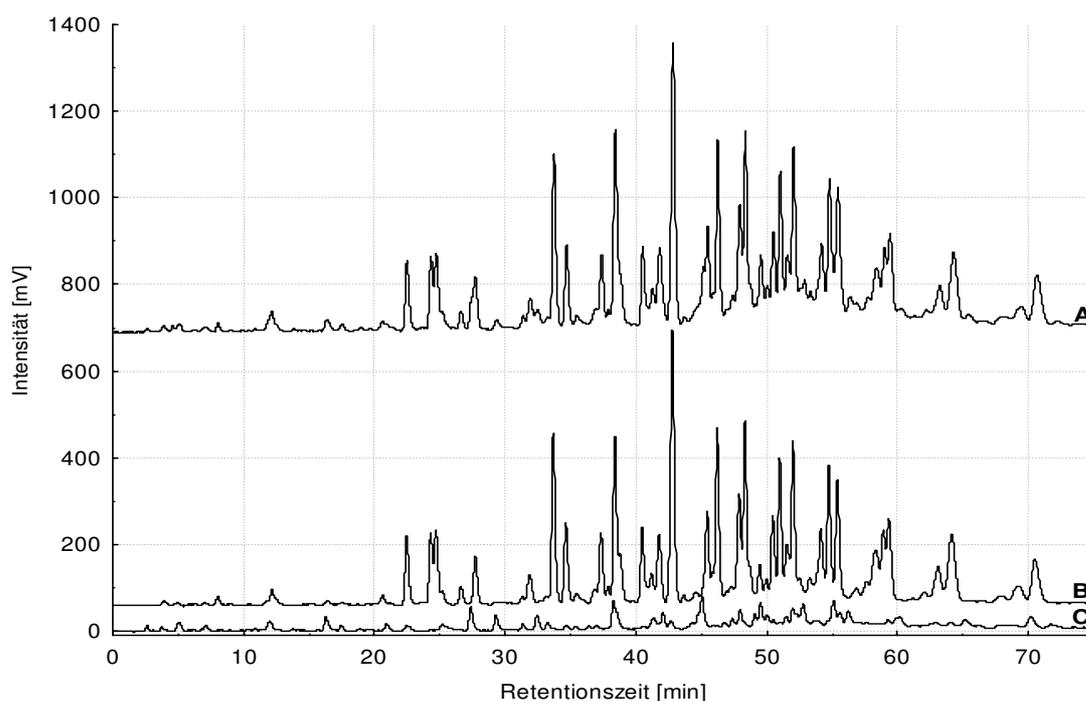


Abb. 3.45: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatings 1, **A**...vor der SPE, **B**...1. Eluat, **C**...2. Eluat; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Beim zweiten Coating sind die Unterschiede wesentlich klarer (Abb. 3.46). Im 1. Eluat fehlen im Vergleich zum Gesamtmigrat deutlich einige Peaks. Diese phenolischen Verbindungen verbleiben auf der Festphase und eluieren mit dem protischen Lösungsmittel im 2. Eluat.

Mittels RP-HPLC/ESI-MSD konnten einige der phenolischen Verbindungen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um nichtepoxidierte Bisphenol-A-Derivate der Epoxidkomponente des Coatings, die aufgrund des BPA-Grundkörpers eine phenolische Hydroxylgruppe besitzen. Phenol-

ische Vernetzungsprodukte beider Basisharze konnten dagegen nicht bestimmt werden. Der Anteil der phenolischen und sauren Substanzen am Gesamtmigrat, bestimmt über den prozentualen Flächenanteil der Chromatogramme beträt bei diesem Epoxy-Phenol-Coating rund 35 %.

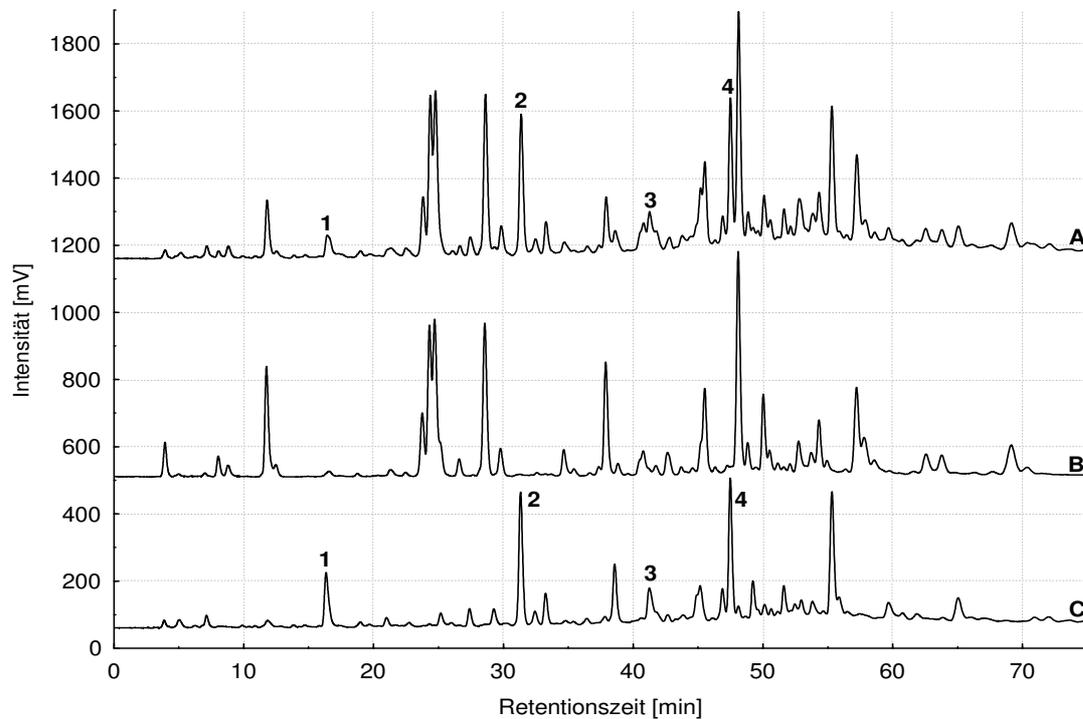


Abb. 3.46: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 2, **A**...vor der SPE, **B**...1. Eluat, **C**...2. Eluat, 1...BAMGE·BuEtOH, 2...BADGE·BPA·BuEtOH, 3...BADGE(n=1)·BPA·BuEtOH, 4...BADGE(n=2)·BPA·BuEtOH; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Bestätigung der SPE mittels Dansylierung des 2. Eluates

Um die Ergebnisse der SPE zu bestätigen wurde das 2. Eluat mit Dansylchlorid derivatisiert. Dabei reagieren, wie im Kapitel 3.1.2 beschrieben nur die phenolischen OH-Gruppen mit dem Reagenz. Durch die anderen Fluoreszenzeigenschaften der entstehenden Derivate werden diese bei den vorliegenden Fluoreszenzbedingungen nicht miterfasst. Die Verbindungen, die detektiert werden, sind demzufolge Substanzen mit Säuregruppen, die bei der SPE ebenfalls am Material binden und erst im 2. Eluat von der Kartusche gespült werden. Voraussetzung für die Umsetzung mit Dansylchlorid ist die Entfernung der Ameisensäure aus dem Eluat, da im sauren Milieu keine Bildung von Phenolaten erfolgt. Dazu wurde die Probe mittels Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand wieder in Acetonitril aufgenommen und anschließend der Derivatisierung zugeführt. Zur Kontrolle, dass es während des Abdampfens nicht zu Veränderungen des Eluates kommt, wurde der mit Acetonitril aufgenommene Rückstand auch ohne Derivatisierung chromatographiert und mit dem Chromatogramm des direkt vermessenen 2. Eluat verglichen. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

In Abb. 3.47 ist das Ergebnis der Derivatisierung im Vergleich zum Eluat ohne Dansylierung für das Epoxid-Phenol-Coating 1 dargestellt. Für die Derivatisierung wurde das 2. Eluat gegenüber der Abb. 3.45 um das 5fache konzentriert.

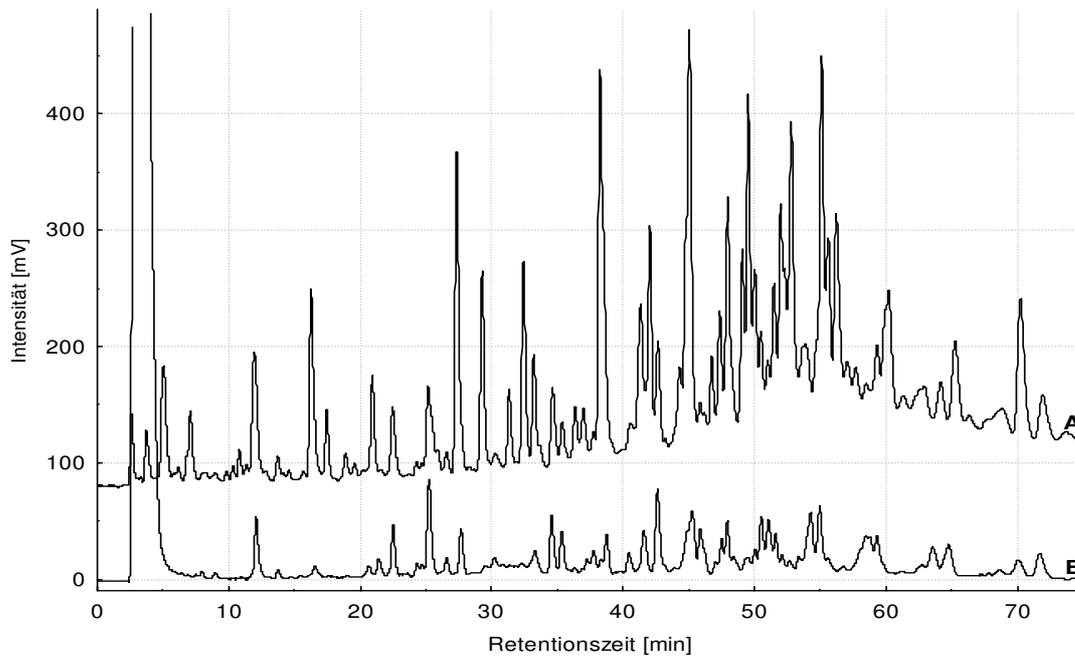


Abb. 3.47: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 1, **A**...2. Eluat, **B**...2. Eluat + Dansylchlorid; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Viele Peaks verschwinden bei der Derivatisierung vollständig, womit sich die Funktionalität der angewendeten SPE bestätigt. Es sind jedoch auch Verbindungen enthalten, die nicht umgesetzt werden. Es lässt sich somit feststellen, dass das 2. Eluat ein Gemisch aus sauren und phenolischen Verbindungen ist. Bestimmt man den Gehalt an sauren Verbindungen aus den prozentualen Flächenanteilen der Chromatogramme so ergibt sich ein Anteil von 30 % am 2. Eluat. Das Gesamtmigrat setzt sich demzufolge aus 7 % Phenolen, 3 % Säuren und 90 % an Verbindungen ohne entsprechende funktionelle Gruppen zusammen.

Auch die Anwendung der Dansylierung auf das 2. Eluat des zweiten Epoxy-Phenol-Coating bestätigt das Ergebnis der SPE (Abb. 3.48). Alle identifizierten phenolischen Verbindungen wurden derivatisiert, aber auch im Migrat dieses Coatings sind Säuren enthalten. Sie machen einen Flächenanteil von 8 % am Gesamtmigrat aus.

Das Gesamtmigrat des Epoxy-Phenol-Coatings 2 besteht somit aus 27 % Phenolen, 8 % Säuren und 65 % an Verbindungen ohne entsprechende funktionelle Gruppen.

Aufgrund der Erkenntnis, dass es sich bei den identifizierten Phenolen um nichtepoxidierte Bisphenol-A-Derivate handelt, wurde eine Abschätzung der Konzentration über die Kalibration eines niedermolekularen Epoxidharzes durchgeführt. Dafür wurde das Bisphenol-A-Harz Araldit MY 740 von *Huntsman Advanced Materials* verwendet, welches überwiegend aus BADGE neben geringen Mengen an Dimer und Trimer besteht. Für das Epoxy-Phenol-Coating 1 konnte somit eine Menge an migrierenden phenolischen Verbindungen von 0,1 mg/dm² und für das Epoxy-Phenol-Coating 2 von etwa 0,27 mg/dm² bestimmt werden.

Im Folgenden wurde geprüft, inwieweit auch eine direkte Dansylierung der Migrate möglich ist, wodurch die zur Isolierung der phenolischen Verbindungen nötige Festphasenextraktion umgangen werden könnte.

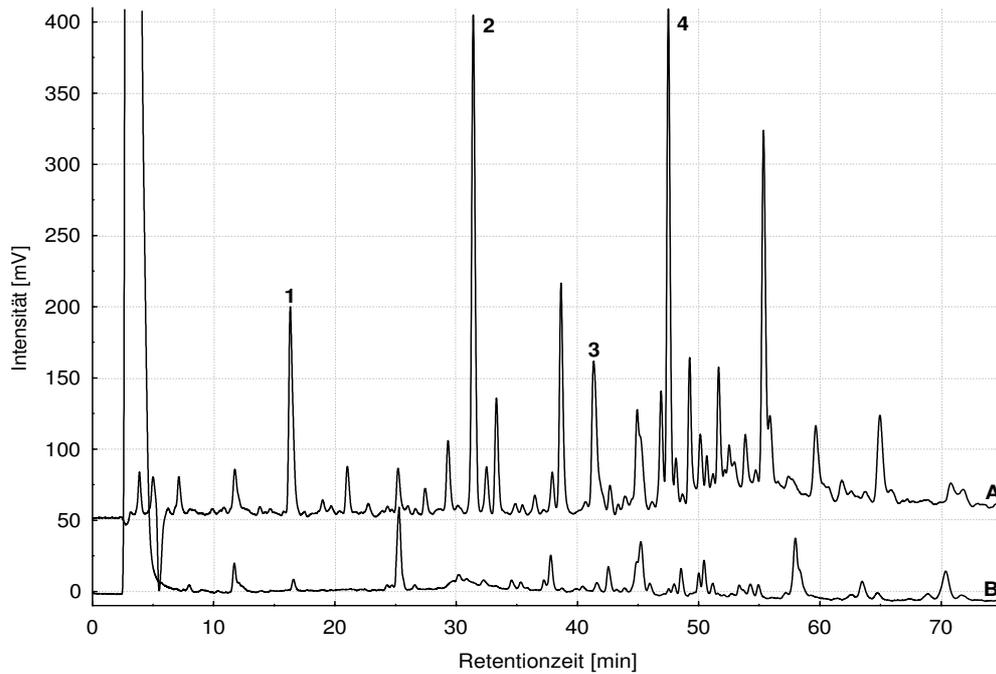


Abb. 3.48: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 2, **A**...2. Eluat, **B**...2. Eluat + Dansylchlorid, 1...BAMGE·BuEtOH, 2...BADGE·BPA·BuEtOH, 3...BADGE(n=1)·BPA·BuEtOH, 4...BADGE(n=2)·BPA·BuEtOH; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

In Abb. 3.49 ist das Chromatogramm des Gesamtmigrates (A) gegenüber dem mit Dansylchlorid derivatisierten Migrat (B) des Epoxy-Phenol-Coatingmigrates 1 dargestellt.

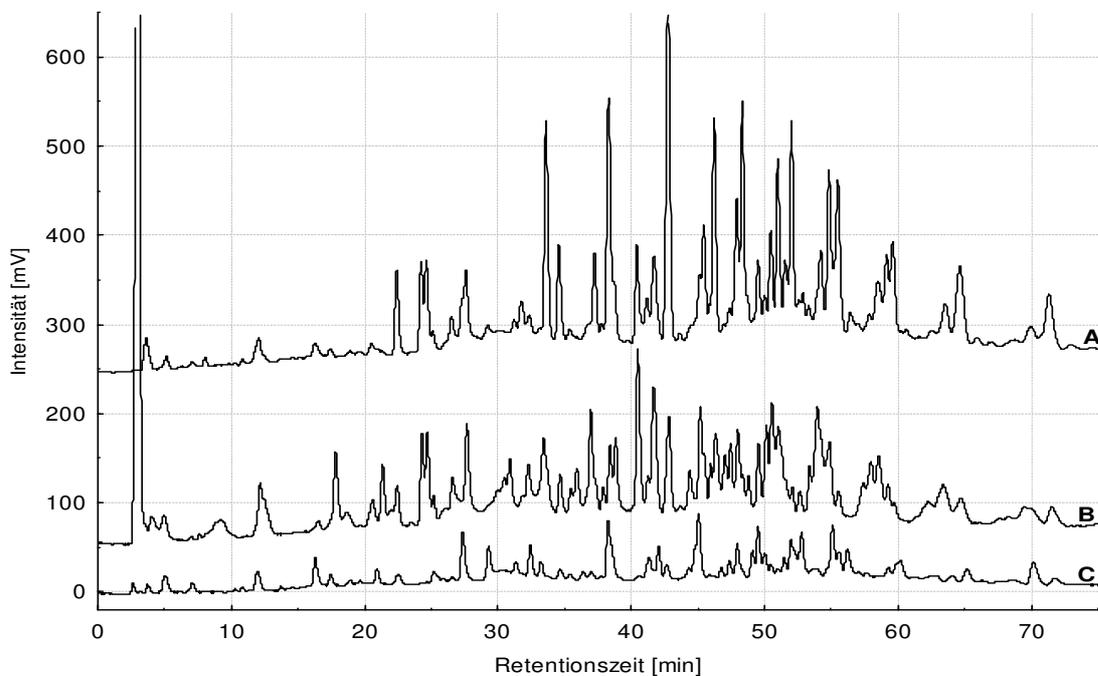


Abb. 3.49: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 1, **A**...Gesamtmigrat, **B**...Gesamtmigrat + Dansylchlorid, **C**...2. Eluat; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Chromatogramm C entspricht dem 2. Eluat der Festphasenextraktion also den phenolischen Verbindungen des Migrates. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Chromatogramm des direkt dansylierten Migrates in stärkerem Maße vom Gesamtmigrat abweicht, als es in Hinblick auf das 2. Eluat der Festphasenextraktion zu erwarten war. Es kommt somit möglicherweise aufgrund des leicht basischen pH-Wertes des Reaktionsansatzes auch zu Umsetzungen anderer Verbindungen. So sind auch hier die Umsetzung hydrochlorierter Derivate zu Oxiranen sowie die Hydrolyse oxirangruppenhaltiger Verbindungen denkbar.

Das Epoxy-Phenolcoatingmigrat 2 zeigt im Gegensatz dazu eine deutlich klarere, von weniger Nebenreaktionen überlagerte Umsetzung mit Dansylchlorid (Abb. 3.50).

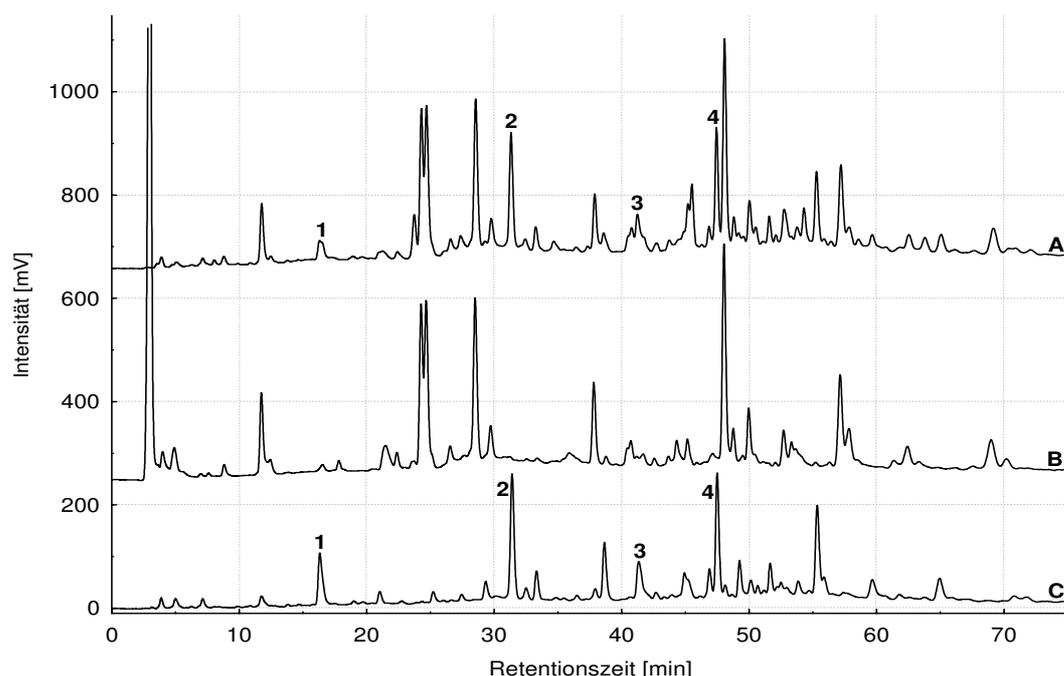


Abb. 3.50: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 2, **A**...Gesamtmigrat, **B**...Gesamtmigrat + Dansylchlorid, **C**...2. Eluat, 1...BAMGE·BuEtOH, 2...BADGE·BPA·BuEtOH, 3...BADGE(n=1)·BPA·BuEtOH, 4...BADGE(n=2)·BPA·BuEtOH; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Alle 4 identifizierten phenolischen Hauptverbindungen werden bei dieser direkten Reaktionsführung vollständig umgesetzt. Andere Reaktionen wie beim Epoxy-Phenolcoatingmigrat 1 sind kaum zu erkennen.

In Anbetracht der möglichen Nebenreaktionen aufgrund des leicht basischen pH-Wertes bei der direkten Dansylierung des Gesamtmigrates, kann man aus der Umsetzung eines Peaks nicht darauf schließen, dass es sich dabei um eine phenolische Verbindung handelt. Die Isolierung der Phenole aus dem Migrat ist somit unumgänglich.

Anwendung der SPE auf Polyester-Phenol-Coatings

Die Migratherstellung bezüglich des kommerziellen Polyester-Phenolcoatings erfolgte analog der Epoxy-Phenolcoatings.

In Abb. 3.51 und Abb. 3.52 sind die Chromatogramme des Gesamtmigrates der 1. Elution und der 2. Elution dargestellt. Aufgrund der fehlenden fluorophoren Eigenschaften der Polyester ist sowohl die Detektion im UV als auch in der Fluoreszenz gegenübergestellt. Bei beiden Detektionsmethoden ist z. T. in beiden Eluaten eine deutliche Veränderung des Peakmusters gegenüber dem Gesamtmigrat feststellbar.

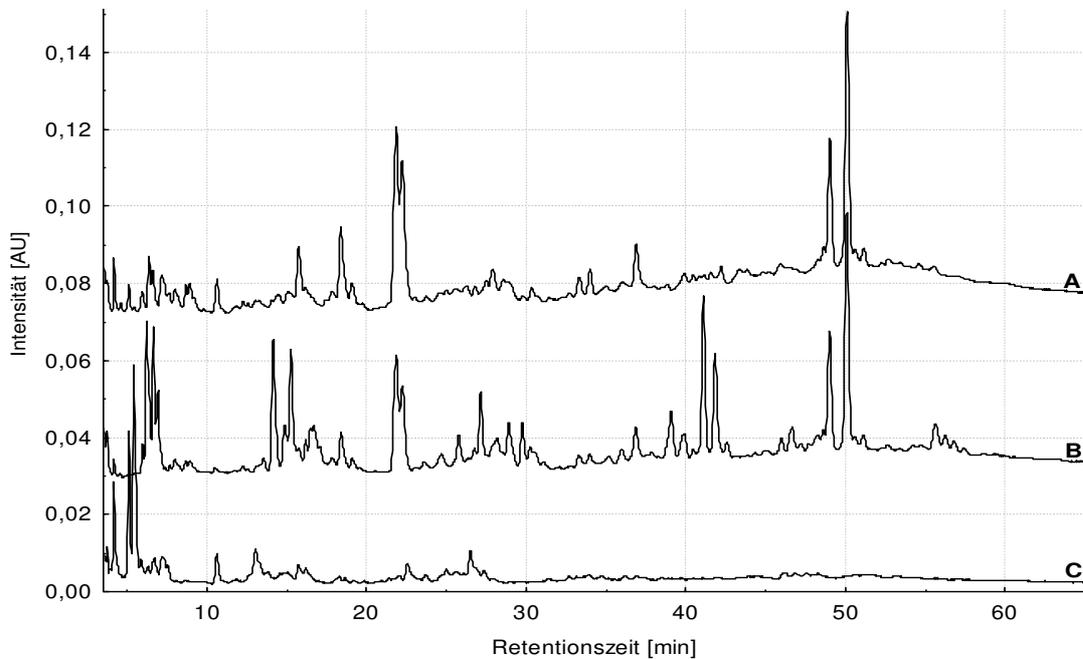


Abb. 3.51: RP-HPLC/UVD_{230nm}-Chromatogramme des Polyester-Phenol-Coatingmigrats, **A**...Gesamtmigrat, **B**...1. Eluat, **C**...2. Eluat; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

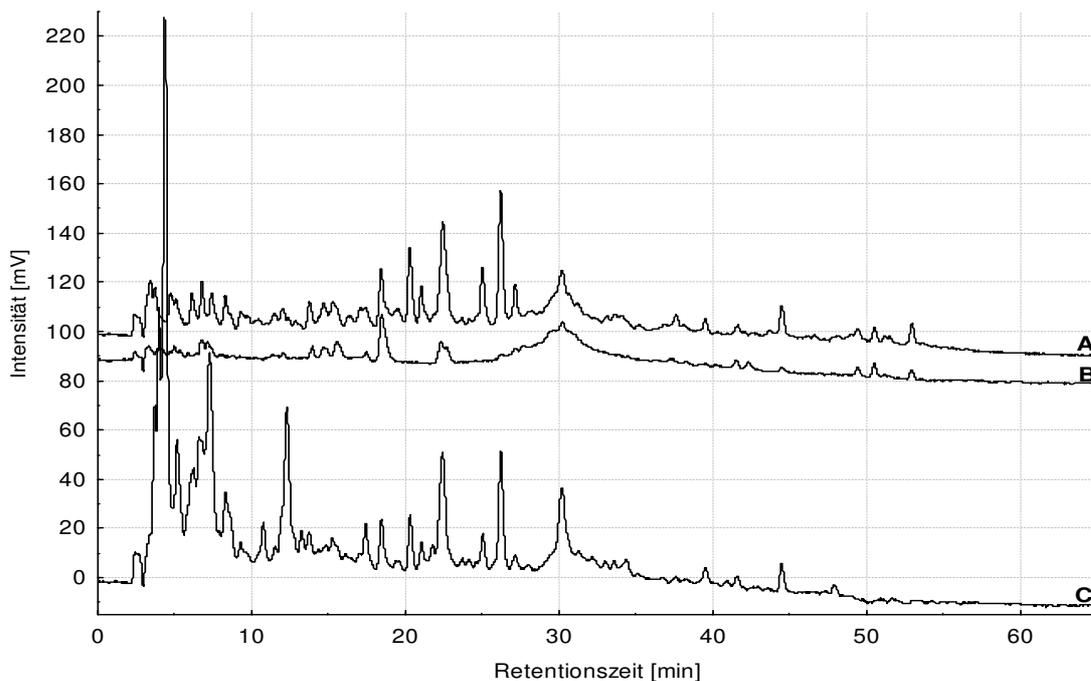


Abb. 3.52: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme des Epoxid-Phenol-Coatingmigrats 2, **A**...Gesamtmigrat, **B**...1. Eluat, **C**...2. Eluat; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.4

Im UV-Chromatogramm der 1. Elution sind neben verschiedenen Peaks, die auch im Gesamtmigrat enthalten sind, etliche weitere Verbindungen detektierbar. Auch in der 2. Elution sind vor allem nahe der Totzeit, im sehr hochpolaren Bereich zusätzliche Peaks erkennbar. Noch deutlicher wird dies im Fluoreszenzchromatogramm der 2. Elution (Abb. 3.52). Andererseits kann man jedoch auch vor allem im Bereich zwischen 15 - 30 min von einer erfolgreichen Retardierung der Phenole ausgehen.

Ein mit dem 2. Eluat vergleichbares Fluoreszenzchromatogramm wurde erhalten, als das Gesamtmigrat mit Lauge versetzt wurde. Grund für die Veränderungen ist wahrscheinlich die Hydrolyse der Esterbindungen aufgrund des basischen Milieus, wie sie auch von Schaefer et al.¹⁸² beschrieben wird. Dabei werden zum einen die Polyester in ihre Ausgangsbestandteile gespalten, zum anderen wird aber auch das polymere Netzwerk zwischen den Polyestern und Phenolen aufgelöst. Die prozentuale Zunahme der Gesamtfläche im Chromatogramm ist möglicherweise auf unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften zwischen den Oligomeren und den Spaltprodukten zurückzuführen.

Im Ergebnis kann davon ausgegangen werden, dass auch bei der Anwendung auf Polyester-Phenolcoatingmigrat die verwendete SPE-Methode in ihrem Prinzip, der Abtrennung von Phenolen in Form von Phenolaten funktioniert. Jedoch ist aufgrund der Verseifung der Esterbindungen und den damit verbundenen Veränderungen der Chromatogramme deren Aussagekraft bezüglich migrierender phenolischer Verbindungen stark eingeschränkt.

3.1.6 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Ebenso auf der Bildung von Phenolaten beruhend, wie bei der Festphasenextraktion sollte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion eine zweite alternative Methode zur Abtrennung von phenolischen Verbindungen entwickelt werden. Dies erfolgte in Anlehnung an die von Biedermann und Grob¹⁰⁸ beschriebene Vorgehensweise (Abb. 3.53).

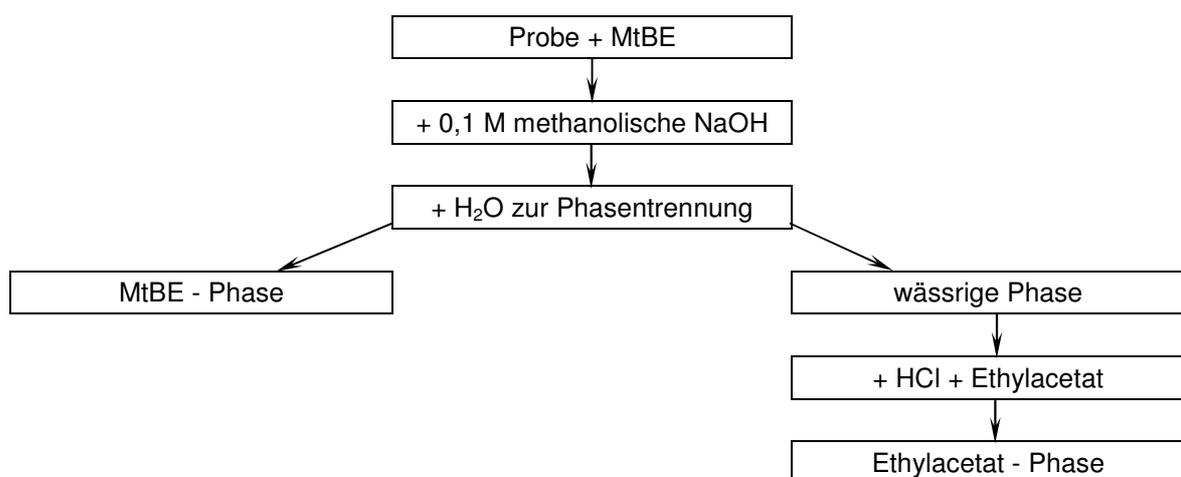


Abb. 3.53: Aufarbeitungsschema zur Flüssig/Flüssig-Extraktion in Anlehnung an Biedermann und Grob¹⁰⁸

¹⁸² Schaefer, A.; Ohm, V.A.; Simat, T.J., Migration from can Coatings: Part 2. Identification and quantification of migration cyclic oligoesters below 1000 Da, Food Addit Contam 2004, Vol. 21, No. 4, 377 - 389.

Dabei wird die Probe im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht in 2 ml MtBE gelöst und anschließend mit 2 ml 0,1 M methanolischer NaOH versetzt. Durch den alkalischen pH-Wert bilden sich Phenolate, die aufgrund ihrer Polarität bei der folgenden Wasserzugabe (~ 2 ml) und daraus resultierenden Phasentrennung eine größere Affinität zum wässrigen Milieu besitzen. Nichtphenolische Substanzen verbleiben in der MtBE-Phase und werden mit dieser abgetrennt. Um auch die phenolischen Verbindungen erfassen zu können, wird die wässrige Phase mit HCl angesäuert. Die Phenole liegen somit wieder undissoziiert vor und können anschließend mit Ethylacetat (2 ml) ausgeschüttelt werden.

Zur Optimierung der Methode wurde die gleiche Mischung an Standardverbindungen verwendet wie bei der Festphasenextraktion (Abb. 3.35).

Unter Verwendung der von Biedermann und Grob¹⁰⁸ beschriebenen Bedingungen konnte bezüglich der Phenole beobachtet werden, dass diese vorrangig in die Ethylacetat-Phase übergehen (70 - 85 %). Geringe Mengen verbleiben jedoch in der MtBE-Phase. BADGE·2H₂O konnte in beiden Extrakten, jedoch mit einem prozentual höherem Anteil in der MtBE-Phase bestimmt werden. Die hydrochlorierten BADGE-Derivate werden mit den Phenolen extrahiert, d. h. sie sind nicht mehr im MtBE-Extrakt detektierbar. Ihre Wiederfindung beträgt jedoch auch in der Ethylacetatphase kaum mehr als 50 %. Analog zur Festphasenextraktion wurde jedoch bereits im Vorfeld der Versuche mit einem Abbau der chlorierten Standards gerechnet. Dies bestätigt sich vor allem auch durch die Wiederfindungsrate von BADGE und BADGE·H₂O von deutlich über 100 %.

Sowohl für BADGE·2H₂O als auch für die hydrochlorierten Verbindungen ist festzustellen, dass der Verteilungskoeffizient zwischen der MtBE-Phase und der alkalischen wässrigen Phase für eine befriedigende Extraktion nicht ausreichend groß ist. Beim Versuch, MtBE gegen Isooctan auszutauschen zeigte sich, dass dieses Lösungsmittel wiederum zu unpolar ist. Die Standards verblieben in der Methanol-Phase. Es wurden somit die ursprünglichen Extraktionsmittel verwendet.

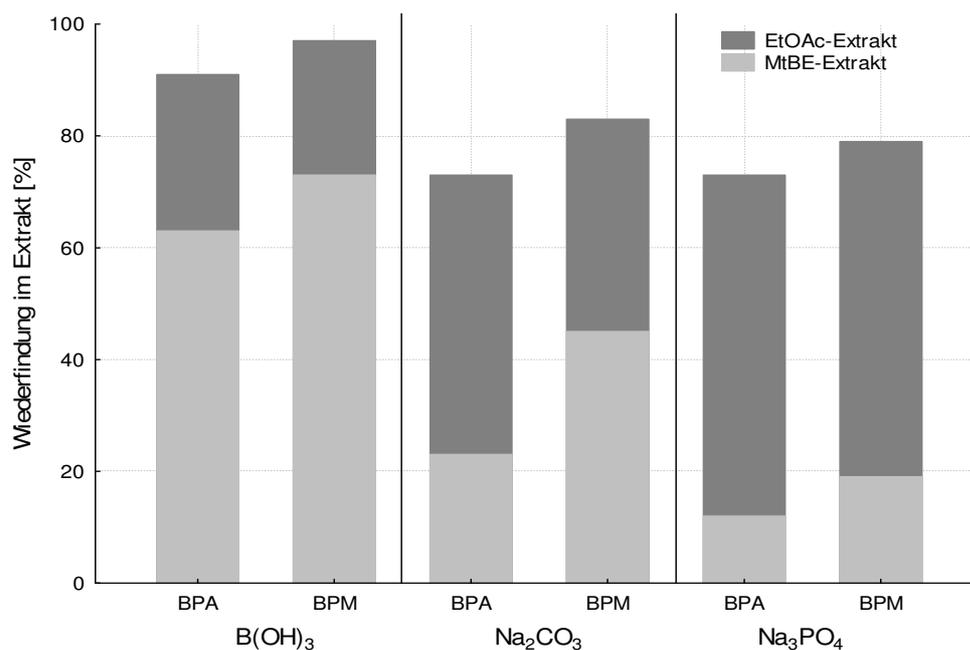


Abb. 3.54: Wiederfindungen von BPA und BPM in den Extrakten der Flüssig-/Flüssigextraktion bei der Verwendung verschiedener Salze

Aufgrund der Ergebnisse bei der Optimierung der Festphasenextraktion wurde anschließend der Einfluss von $B(OH)_3$, Na_2CO_3 und Na_3PO_4 auf die Extraktion der Standards getestet. Auch hierbei konnte bei keinem der verwendeten Salze eine vollständige Extraktion der phenolischen Verbindungen beobachtet werden. Die besten Ergebnisse bei der Verwendung dieser drei Salze wurden mit Na_3PO_4 erzielt, die Wiederfindungsraten der Versuche mit NaOH wurden jedoch nicht erreicht (Abb. 3.54).

Im Allgemeinen konnte auch hier beobachtet werden, dass mit abnehmendem pK_s -Wert der Salze der Abbau der hydrochlorierten Verbindungen weniger ausgeprägt ist.

Aufgrund der schlechteren Ergebnisse gegenüber der Verwendung von NaOH wurde im Folgenden anhand der Extraktionsbedingungen versucht, den Abbau der hydrochlorierten BADGE-Derivate zu forcieren, um diese Verbindungen somit aus dem Chromatogramm des 2. phenolischen Extraktes zu eliminieren. Um dies zu erreichen, wurde die Konzentration der methanolischen NaOH von 0,1 M auf 0,5 M erhöht. Außerdem wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe der methanolischen NaOH für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Gleichzeitig wurde die Extraktion in Abhängigkeit des verwendeten Volumens an methanolischer NaOH untersucht.

Dabei ist deutlich zu sehen, dass bei keiner Extraktion ein optimales Ergebnis erreicht werden konnte (Abb. 3.55). Ein fast vollständiger Abbau der hydrochlorierten Verbindungen ist bei der Verwendung von 0,5 ml methanolischer NaOH zu beobachten. Lediglich $BADGE \cdot H_2O \cdot HCl$ ist zu 5 % im 2. Extrakt der Phenole noch bestimmbar. Die Wiederfindungen von BADGE und $BADGE \cdot H_2O$ nehmen entsprechend hohe Werte von über 150 % an. Im Gegensatz dazu ist jedoch keine vollständige Extraktion der phenolischen Verbindungen zu verzeichnen. So sind im MtBE-Extrakt noch 5 - 18 % der Phenole enthalten.

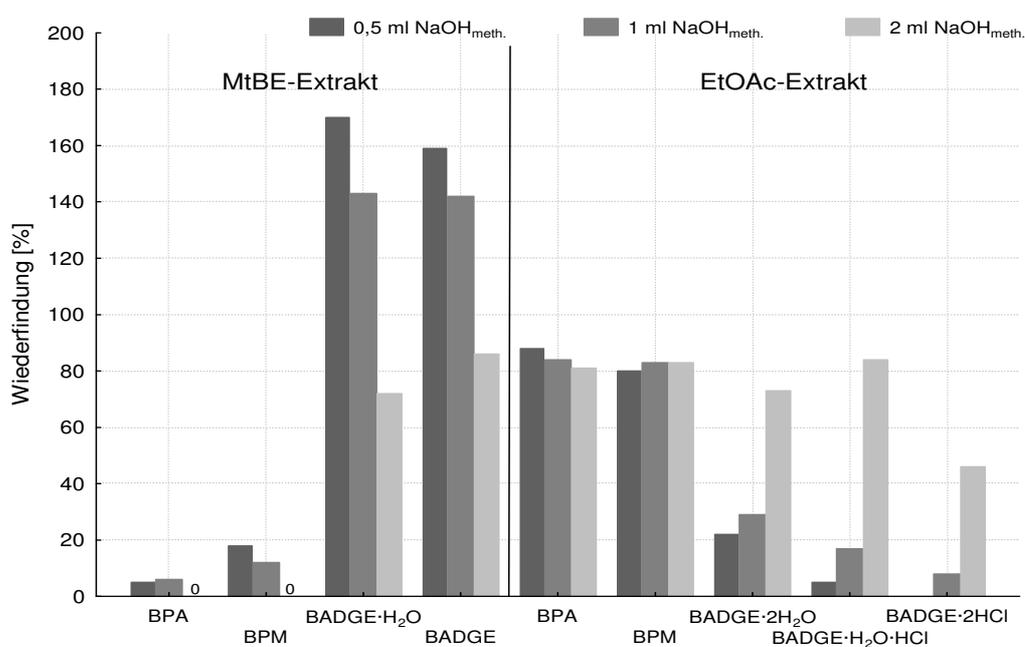


Abb. 3.55: Abhängigkeit der Extraktion vom verwendeten Volumen an methanolischer NaOH

Beim Einsatz von 1 ml methanolischer NaOH zur Alkalisierung der MtBE-Probe Lösung konnten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Phenole beobachtet werden. Der Abbau der hydrochlorierten Verbindungen ist jedoch weniger vorangeschritten. Ebenso wenig positiv sind die Resultate bei der Verwendung von 2 ml methanolischer NaOH. Im Gegensatz zu den beiden anderen Volumina ist zwar eine vollständige Extraktion der Phenole zu beobachten, der Abbau der hydrochlorierten BADGE-Derivate erfolgte jedoch in einem weitaus geringeren Umfang. Des Weiteren zeigte sich, dass mit zunehmenden Volumen an methanolischer NaOH der Gehalt an BADGE·2H₂O im 2. Extrakt zunimmt.

Die Wiederfindungen der phenolischen Verbindungen im 2. Extrakt um 80 % sind mit denen von Brede et al.¹¹⁹, die unter anderem BPA und BPF mittels kombinierter Flüssig-Flüssig-Extraktion/SPE aus Olivenöl extrahierten, vergleichbar.

Die vollständige Abtrennung der phenolischen Standardverbindungen von den nichtphenolischen Substanzen konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht erreicht werden.

Inwieweit höhermolekulare Phenole die gleichen Ergebnisse zeigen, wurde mit der Verwendung eines Phenolharzes getestet. Dabei war zu beobachten, dass der Hauptteil der phenolischen Verbindungen in der MtBE-Phase verblieb. Daraus lässt sich schließen, dass die höhermolekularen phenolischen Verbindungen des Harzes trotz Phenolatbildung zu unpolar sind, um in die wässrige Phase überzugehen. Einige Phenole konnten dagegen weder im MtBE- noch im Ethylacetat-Extrakt bestimmt werden. Zudem zeigten sich vor allem in den frühen und späten Retentionszeitbereichen der Chromatogramme Veränderungen im Peakmuster. Diese konnten auf die Verwendung der methanolischen NaOH zurückgeführt werden. Dabei ist zu vermuten, dass niedermolekulare phenolische Verbindungen über freie Methylolgruppen im basischen Milieu oligomerisieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse und in Anbetracht einer funktionierenden Festphasenextraktion wurde an dieser Stelle die Optimierung der Flüssig-/Flüssigextraktion abgebrochen. Möglicherweise könnten jedoch durch die Wahl anderer Extraktionsmittel oder unter Verwendung mehrerer Extraktionsstufen bessere Ergebnisse erzielt werden.

3.1.7 Toxikologische Untersuchungen phenolischer Verbindungen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt besitzt der Hauptteil der migrierenden phenolischen Verbindungen ein Molekulargewicht von unter 1000 Da. Es ist dabei davon auszugehen, dass diese Substanzen je nach Veretherungsgrad aus bis zu 5 - 6 Phenolkernen pro Molekül bestehen. Während für BPA als dimere Verbindung ein spezifisches Migrationslimit rechtlich geregelt ist, gibt es für andere mehrkernige Phenole keine gesetzlichen Grenzwerte für die Migration. In gleicher Weise sind in der Literatur nur toxikologische Untersuchungen zu Monomen, meist halogenierten Phenolen zu finden.^{3, 4} Ob oligomere Phenole unterschiedlichen Molekulargewichtes toxikologische Effekte hervorrufen ist bisher nicht untersucht wurden. Um einen Einblick in die toxikologische Relevanz solcher phenolischer Verbindungen zu erhalten, wurden sowohl mehrere phenolische Standardsubstanzen, die einerseits kommerziell erhältlich waren, andererseits aber auch selbst synthetisiert wurden, als auch verschiedene Molekulargewichtsfractionen eines Phenolharzes, im Fischembryotest und/oder Neutralrottest untersucht.

Darstellung von Phenololigomeren

Bei der Untersuchung verschiedener phenolischer Einzelsubstanzen in den Toxizitätstests sollte das Hauptaugenmerk auf der unterschiedlichen Lipophilie sowie dem Molekulargewicht liegen.

Da kaum Einzelverbindungen, wie sie in Phenolharzen vorkommen können, kommerziell erhältlich sind, wurde die Synthese von Phenololigomeren angestrebt. In Anlehnung an verschiedene in der Literatur beschriebene Arbeiten wurde dazu die Selbstkondensation von 4-Hydroxymethylphenol (4-HMP) gewählt (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: verschiedene Reaktionsansätze zur Selbstkondensation von 4-HMP

Quelle	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	identifizierte Verbindungen (Abb. 3.56)
Yeddanapalli et al. 1962 ¹⁸³	- 4-HMP gelöst in NaOH-Lösg. - unterschiedlich molarer Verhältnisse	80 °C, 0 – 24h	2, 3, 6, 8
Grenier-Loustalot et al. 1996 ¹⁸⁴	- Monomer in H ₂ O gelöst - pH 8 mit NaOH eingestellt	60 °C	2, 3, 8
Higuchi et al. 2001 ¹⁸⁵	- 4-HMP gelöst in NaOH-Lösg. - unterschiedl. molarer Verhältnisse	100 °C, 120 min	2, 3, 8 + 2 Dimere (M 260, M 230), 2 Trimere (M 336, M 306) und ein Tetramer (M 412)
Conner et al. 2001 ¹⁸⁶	- Monomer gelöst in H ₂ O/DMF (5:1 v/v) → 10 %ige Lösg. - pH 10 mit NaOH (0,4 mmol) eingestellt - 0,3 mmol Ethylformiat oder Propylencarbonat oder γ -Butyro-lacton oder 0,1 mmol Triacin	- 0 - 180 min - 20 °C mit Katalysator - 60 °C ohne Katalysator	2, 3, 6
Biedermann und Grob 2006 ¹¹¹	- 200 mg 4-HMP, 1 μ l Additol XK 406	1 h, 150 °C	1 – 6 (Verb. 5 - 2 Isomere)

4-HMP ist im Vergleich zu 2-Hydroxymethylphenol (2-HMP) deutlich reaktiver (Reaktivität 4-HMP/2HMP = 0,708/0,46). Aufgrund der strukturellen Nähe der Methylolgruppe zur phenolischen Hydroxylgruppe im 2-HMP-Molekül kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden funktionellen Gruppen, wodurch seine Reaktivität gegenüber intermolekularen Wechselwirkungen reduziert ist.¹⁸⁷

¹⁸³ Yeddanapalli, L.M.; Francis, D.J., Kinetics and Mechanism of the Alkali Catalysed Condensation of o- and p- Methylol Phenols by Themselves and with Phenol, Makromol Chem 1962, Vol. 55, 74 - 86.

¹⁸⁴ Grenier-Loustalot, M.F.; Larroque, S.; Grenier, P.; Bedel, D., Phenolic resins: 4. Self-condensation of methylolphenols in formaldehyde-free media, Polymer 1996, Vol. 37, No. 6, 955 - 964.

¹⁸⁵ Higuchi, M.; Yoshimatsu, T.; Urakawa, T.; Morita, M., Kinetics and Mechanisms of the Condensation Reaction of Phenolic Resins II. Base-Catalyzed Self-Condensation of 4-Hydroxymethylphenol, Polym J 2001, Vol. 33 No. 10, 799 - 806.

¹⁸⁶ Conner, A.H.; Lorenz, L.F.; Hirth, K.C., Accelerated Cure of Phenol-Formaldehyde Resins: Studies With Model Compounds, J Appl Polym Sci 2002, Vol. 86, 3256 - 3263.

¹⁸⁷ Francis, D.J.; Yeddanapalli, L.M., Kinetics and Mechanism of the Alkali-catalysed Condensations of Di- and Tri-Methylol Phenols by Themselves and with Phenol, Makromol Chem 1969, Vol. 125, 119 - 125.

Insgesamt erfolgte in der vorliegenden Literatur die Identifizierung von 9 Oligomerisierungsprodukten (Abb. 3.56). Aufgrund der dirigierenden Effekte der phenolischen OH-Gruppe und der Hydroxymethylgruppe für eintretende Substituenten in ortho-Stellung erfolgt die Verknüpfung der Monomere bei der Substitution am Aromaten in der Regel über eine ortho/para - Verknüpfung. Verbrückungen über para/para - Positionen werden dagegen bei der Reaktion zweier Hydroxymethylgruppen erhalten. Ortho/ortho - Bindungen sind dagegen bei der Selbstkondensation von 4-HMP nur über die Zwischenreaktion der Monomere mit Formaldehyd möglich.

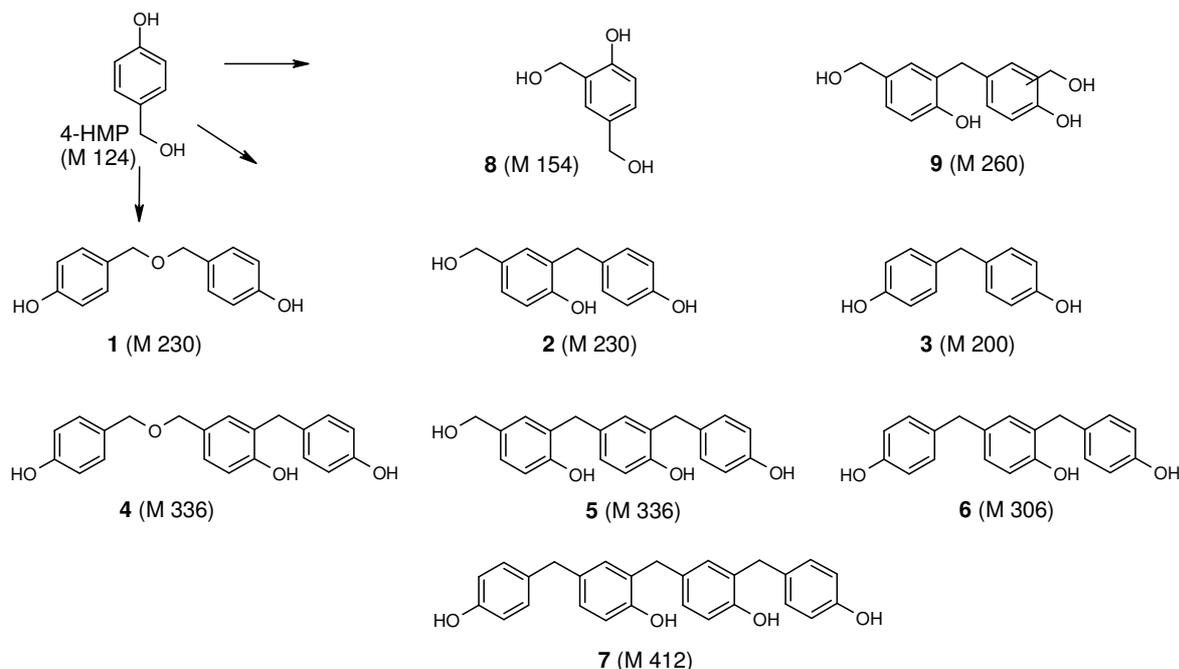


Abb. 3.56: in der Literatur beschriebene Reaktionsprodukte der Selbstkondensation von 4-HMP

Bereits 1962 beschäftigten sich Yeddanapalli et al.¹⁸³ mit der Selbstkondensation von Hydroxymethylphenolen. Sie beschrieben den Reaktionsmechanismus in Abhängigkeit des Verhältnisses von Monomer und verwendeter NaOH. Neben den zwei Dimeren M 230 [2] und BPF (M 200) [3] gelang es ihnen, bei entsprechendem 4-HMP/NaOH-Verhältnis auch das Trimer 2,4-Bis(4-hydroxybenzyl)-phenol (M 306) [6] zu identifizieren.

Grenier-Loustalot et al.¹⁸⁴ bestimmten im Gegensatz zu den anderen Arbeitsgruppen nur zwei dimere Kondensationsprodukte, was möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Reaktions-temperatur und einen niedrigen pH-Wert zurückzuführen ist. Durch die Bildung von 2,4-Dihydroxymethylphenol (2,4-DHMP, M 154) [8] konnten sie zeigen, dass sich während der Reaktion freier Formaldehyd bildet. Im verwendeten Formaldehyd-freien Reaktionsansatz entsteht dieser bei der Kondensation anderer Oligomere.

Conner et al.¹⁸⁶ konnten bei ihren Versuchen zum Einfluss von Härtungsbeschleunigern auf die Selbstkondensation von 4-HMP zusätzlich eine trimere Verbindung identifizieren. Dabei verwendeten sie als Reaktionslösungsmittel etwa 15 %iges DMF und ebenso wie Grenier-Loustalot et al.¹⁸⁴ geringe Temperaturen, aber einen deutlich höheren pH - Wert.

Die zahlreichsten Verbindungen konnten Biedermann und Grob¹¹¹ strukturell aufklären. Bezüglich der Reaktionsbedingungen verwendeten sie die höchste Temperatur und als einzigste einen kommerziell erhältlichen, auf eine beschleunigte Vernetzungsgeschwindigkeit ausgelegten Katalysator. Dieser setzt sich aus einer Phenolharzkomponente, verschiedenen Lösungsmitteln und etwa 9 % Phosphorsäure zusammen. Daneben gelang es nur ihnen, als Produkte der Selbstkondensation Oligomere mit Dimethylenetherbrücken zu erfassen. Dies ist möglicherweise auf den durch den Katalysator verursachten leicht sauren pH-Wert zurückzuführen. So findet die Reaktion zweier Hydroxymethylgruppen unter Abspaltung von Wasser zu einem dimethylenetherverbrückten Oligomer nach Grenier-Loustalot et al.¹⁸⁴ nur im sauren oder neutralen Milieu statt. Gleiches beschreiben Tonge et al.¹⁸⁸ in ihrer Arbeit zur Selbstkondensation von 2,4- bzw. 2,6-Dihydroxymethylphenol.

Higuchi et al.¹⁸⁵ benannten nur 3 4-HMP-Oligomere konkret. Daneben konnten sie jedoch anhand des ermittelten Molekulargewichtes 5 weitere Substanzen nach ihren Monomereinheiten klassieren. Neben 2,4-DHMP [8] identifizierten sie dabei eine weitere dimere Verbindung (M 260) [9], die durch Reaktion mit freiem Formaldehyd gebildet wird.

Für die vorliegende Arbeit wurden aus den vorgestellten Methoden der Literatur einzelne Reaktionsbedingungen entnommen. Die Selbstkondensation erfolgte danach zunächst in 50 % DMF und unter Verwendung von Additol XK 406 als Katalysator. Mit NaOH wurde der pH-Wert auf etwa 10 eingestellt und der Ansatz anschließend für 1 h bei 150 °C erhitzt. Nach erfolgter Verdünnung wurde die Probe direkt mittels RP-HPLC/UV_{D273nm} chromatographiert (Abb. 3.57).

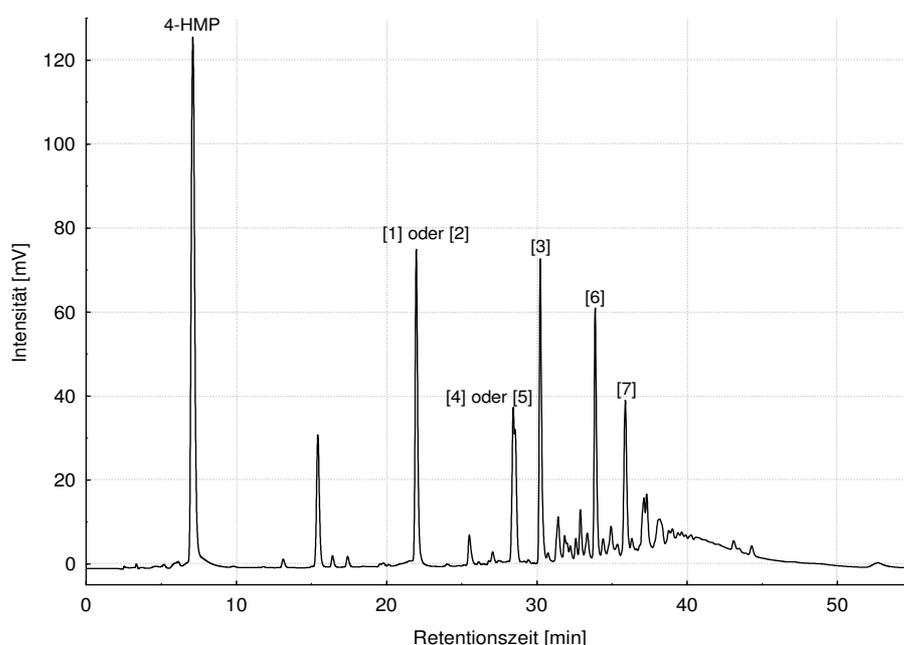


Abb. 3.57: RP-HPLC/UV_{D273 nm} - Chromatogramm des Reaktionsansatzes nach 1 h, 150 °C, Zuordnung der Peaknummern siehe Abb. 3.56; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.5

¹⁸⁸ Tonge, L.Y.; Hodgkins, J.; Blicblau, A.S.; Collins, P.J., Effect of initial Phenol-Formaldehyde (PF) Reactions on the Curing Properties of the PF resin, *J Therm Anal Cal* 2001, Vol. 63, 721 - 730.

Mittels LC/ESI_{pos}-MSD und/oder LC/ESI_{neg}-MSD konnten für einige Verbindungen, die in der Literatur beschriebenen Molekulargewichte bestimmt werden. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt eine genaue strukturelle Zuordnung nicht möglich.

In Abb. 3.58 ist die Bildung der Reaktionsprodukte in Abhängigkeit der Reaktionszeit dargestellt. In Übereinstimmung mit Higuchi et al.¹⁸⁵ erfolgt die Reaktion bereits in den ersten Minuten, wenn auch in unterschiedlichem Maße für die einzelnen Oligomere. Das Dimer mit der Molmasse M 230 Da ist in den ersten 50 min Hauptprodukt der Selbstkondensation, wobei dessen Konzentration ab etwa 15 min im Reaktionsansatz wieder kontinuierlich abnimmt. Ein ähnliches Bildungsverhalten, aber weniger deutlich zeigen BPF [3] und die Verbindungen M 336 Da ([4] o. [5]). Verbindung [6] und [7] erreichen nach anfänglicher zunehmender Bildungsrate ein konstantes Konzentrationsplateau.

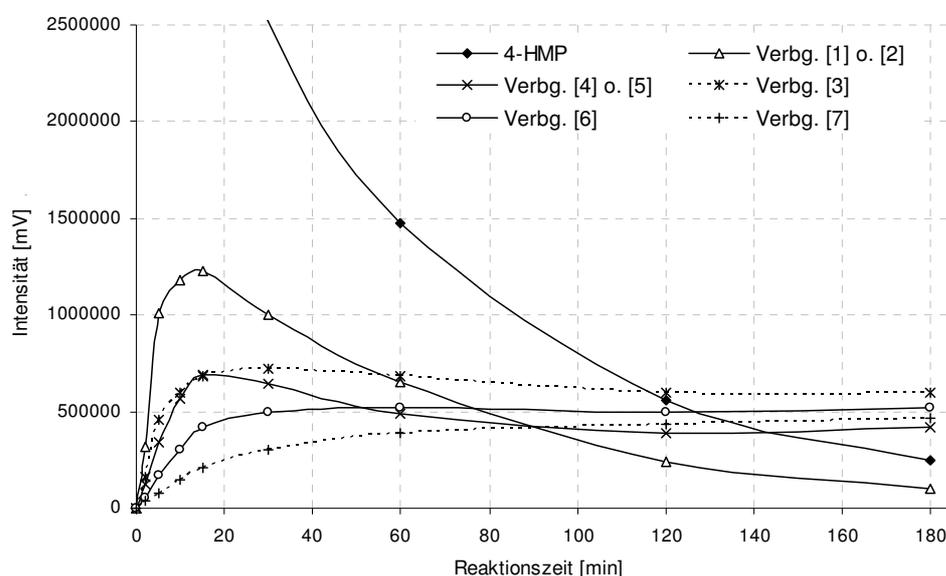


Abb. 3.58: Reaktionsverlauf der Selbstkondensation von 4-HMP im Zeitraum von 0 - 180 min; Zuordnung der Peaknummern siehe Abb. 3.56

Higuchi et al.¹⁸⁵ bestimmten für die Selbstkondensation bei einem molaren Verhältnis von NaOH/4-HMP zwischen 0,3 und 1,0 und einer Konzentration von 4-HMP unter 1 mol/l eine Reaktionsordnung von rund 1,3, wobei sowohl unimolekulare als auch bimolekulare Reaktionen gleichzeitig als geschwindigkeitsbestimmende Schritte nebeneinander ablaufen.

Zur präparativen Darstellung der Phenololigomere wurde anhand der Abb. 3.58 eine Reaktionszeit von 60 min gewählt, da zu diesem Zeitpunkt ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den einzelnen Verbindungen herrscht.

Des Weiteren sollte der Katalysator im präparativen Ansatz nicht verwendet werden, um möglichst reine Verbindungen zu erhalten. Es sollte somit ausgeschlossen werden, dass Effekte in den Toxizitätstests auftreten, die nicht auf die Oligomere zuzuführen sind. Da beim Ansatz mit analytischen Mengen kein Unterschied zwischen der Reaktion mit und ohne Katalysator beobachtet werden konnte, waren keine Veränderungen an den Reaktionsbedingungen nötig.

Möglicherweise besitzt der Katalysator nur einen auf das saure Milieu eingeschränkten Wirkungsbereich, so dass eine Einflussnahme auf die Umsetzung von 4-HMP unter den gewählten Bedingungen nicht erfolgte.

Eine weitere Veränderung gegenüber dem analytischen Ansatz musste bezüglich des verwendeten Lösungsmittels vorgenommen werden. DMF ist aufgrund seines hohen Siedepunktes und als sehr guter Lösungsvermittler schwer abzutrennen. Um eine erste Isolierung der Phenole in Anlehnung an die Arbeit von Conner et al.¹⁸⁶ mittels Flüssig/Flüssigextraktion zu ermöglichen, musste ein anderes Lösungsmittel eingesetzt werden. Es erfolgten Versuche mit THF anstatt DMF und im rein wässrigen Milieu, bei gleicher Temperatur und Reaktionszeit. Während keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung von THF und DMF zu beobachten waren, zeigte sich im Vergleich bei der Reaktion in Wasser eine deutlich fortgeschrittenere Oligomerisierung. Die niedermolekularen Verbindungen im vorderen Teil des Chromatogrammes waren fast vollständig abreagiert. Im Retentionszeitbereich nach 30 min war dagegen eine klare Intensitätszunahme der Peaks zu verzeichnen. Für die Oligomerisierung in Wasser wurde die Reaktionstemperatur daher von 150 °C auf 100 °C gesenkt. Dies reduzierte die Vernetzungsgeschwindigkeit deutlich, das Peakmuster war wieder mit dem in Abb. 3.57 vergleichbar.

Conner et al.¹⁸⁶ verwendeten zur Extraktion der Produkte Chloroform nach Ansäuerung des Reaktionsmixes mit Essigsäure. Die Säure ist dabei zur Protonierung der Phenololigomere nötig, damit der Verteilungskoeffizienten zu Gunsten der organischen Phase verschoben wird. Es erfolgte jedoch ein Austausch der Essigsäure gegen HCl, um zu vermeiden, dass die Säure ebenfalls extrahiert wird. Bei der Extraktion wurde zunächst ebenfalls mit Chloroform gearbeitet. Es wurde dabei festgestellt, dass ein Großteil der Oligomeren nur zu einem geringen Teil in die organische Phase übergeht. Chloroform ist möglicherweise für die vergleichsweise niedermolekularen Oligomere zu unpolar. Seine Elutionsstärke (ϵ°) gegenüber Silicagel wird von Meyer¹⁸⁹ mit 0,31 angegeben. Als weiteres Extraktionsmittel wurde deshalb MtBE gewählt, dessen Elutionsstärke mit 0,48 und somit auch seine Polarität deutlich über der des Chloroforms liegt. Bei der Verwendung verschiedener Mischungen beider Lösungsmittel konnte beobachtet werden, dass sich die Extraktion der Oligomere mit zunehmendem Anteil an MtBE in Chloroform verbesserte. Um jedoch bereits bei diesem Schritt einen Teil des nicht umgesetzten Monomers abzutrennen, wurde im Folgenden ein Anteil von 30 % MtBE in Chloroform gewählt. Bei dieser Mischung ging bereits der größte Teil der Oligomere in die organische Phase über, gleichzeitig verblieb aber auch eine gewisse Menge 4-HMP in der wässrigen Phase. Nach der Extraktion wurde die organische Phase noch mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet.

Im Anschluss an die Flüssig/Flüssigextraktion sollte zur weiteren Isolierung der Phenole zunächst eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht mittels präparativer SEC-UVD_{273nm} erfolgen. Dazu wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Elutionsmittel für die SEC in THF wieder aufgenommen. Aus den erhaltenen Molekulargewichtsfractionen sollten danach die einzelnen

¹⁸⁹ Meyer, V.R., Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, aktualisierte, 9. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004.

Verbindungen über die präparative NP-HPLC/UVD_{230nm} gewonnen werden. Zur weiteren Reinigung der Substanzen bestand außerdem die Möglichkeit der Anwendung einer präparativen DC.

Die Fraktionierung des Reaktionsgemisches erfolgte in sieben Zeitfenstern orientiert an den Intensitäts-Maxima des SEC-Chromatogrammes (Abb. 3.59). Anschließend wurden die einzelnen gesammelten Fraktionen auf ein gleiches Volumen konzentriert. Aus diesem Grund entsprechen diese in ihrer Konzentration bei der anschließenden Rechromatographie nicht der Ausgangskonzentration im Gemisch.

Wie erwartet kommt es, obwohl zwischen den einzelnen Fraktionen kleine Pausen gelassen wurden, vor allem im hochmolekularen Bereich zu Überschneidungen (Abb. 3.59).

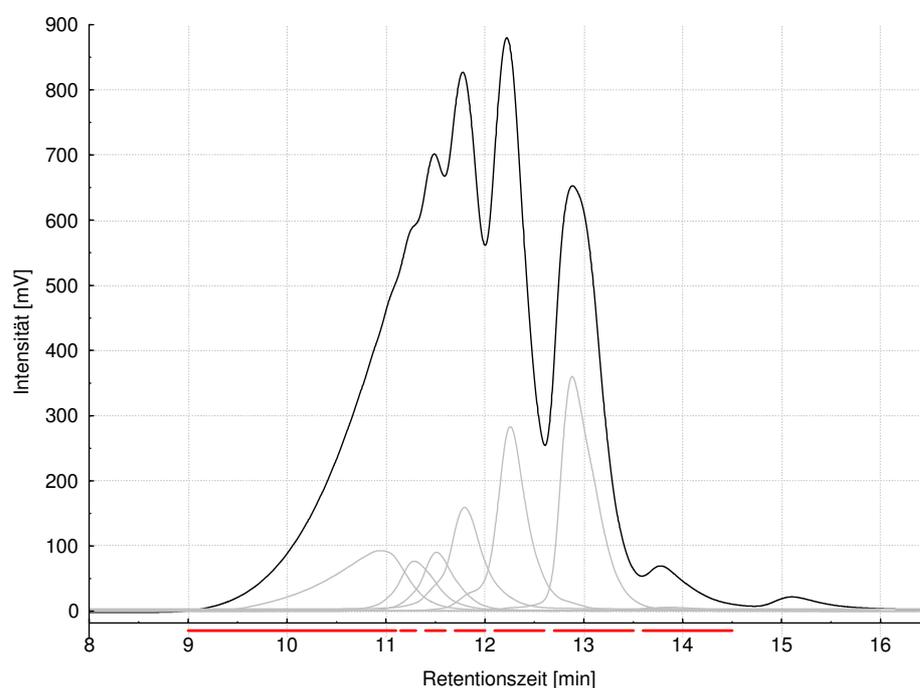


Abb. 3.59: SEC-UVD_{295nm} - Chromatogramme des Reaktionsmixes sowie der in den markierten Zeitenräumen fraktionierten Molmassenfraktionen; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.5

Dies ist, wenn auch weniger deutlich ebenfalls in den RP-Chromatogrammen zu erkennen (Abb. 3.60). Sowohl das Trimer mit der molaren Masse 336 Da (Verbg. 4 oder 5) als auch das Tetramer (Verbg. 7) sind in zwei Fraktionen enthalten. Alle anderen Substanzen konnten mittels SEC gut getrennt werden und befinden sich hauptsächlich nur in einer Fraktion.

In Hinblick auf die weitere Isolierung der einzelnen Phenololigomeren konnten die Fraktionen 1, 2, 6 und 7 im Folgenden vernachlässigt werden, da diese keine Zielsubstanzen, oder diese nur in geringen Mengen enthielten. Über Fraktion 6 wurde somit das nicht umgesetzte Monomer abgetrennt, sowie eine Substanz die mittels LC/ESI_{pos}-MSD bzw. LC/ESI_{neg}-MSD nicht identifiziert werden konnte.

Fraktion 7 enthielt nur diese nicht identifizierte Substanz und mit der ersten Fraktion konnte ein Großteil der hochmolekularen, schon nicht mehr basisliniengetrennten Oligomere separiert werden.

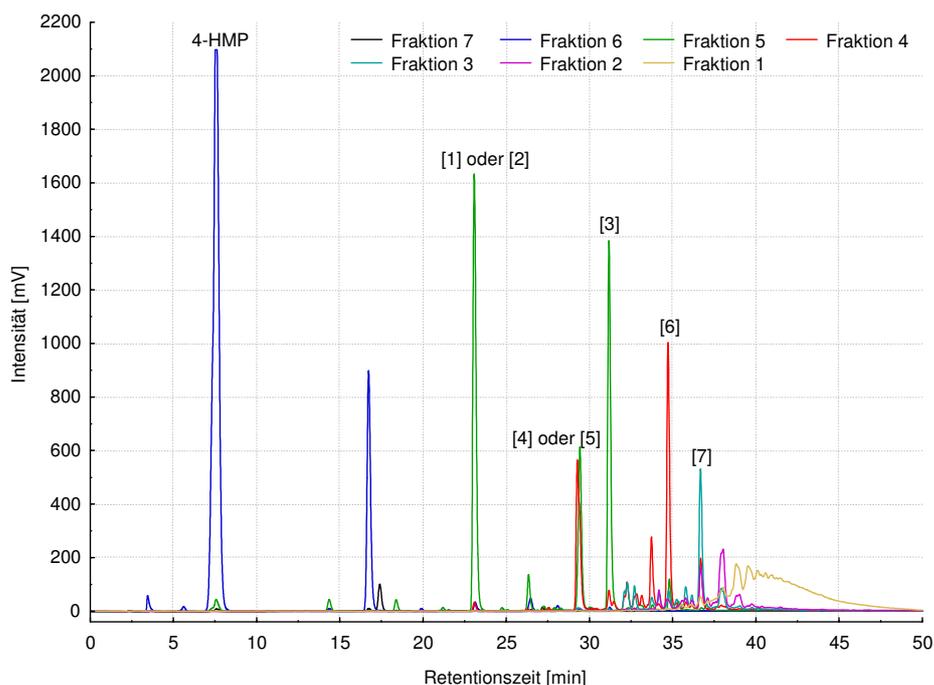


Abb. 3.60: RP-HPLC/UV_{D273nm} - Chromatogramme der SEC-Fractionen; Zuordnung der Peaknummern siehe Abb. 3.56; chromatographische Bedingungen: s. Kap. 5.3.5

Bei der Verbindung 3 handelt es sich um BPF [3], was mit Standardaddition und LC/ESI-MSD bewiesen wurde. Da dieses kommerziell erhältlich ist, wurde auch dieser Peak bei der weiteren Isolierung nicht berücksichtigt.

Es blieben somit 4 Substanzen verteilt auf 3 Fraktionen die im Folgenden mittels präparativer NP-HPLC/UV_{D273nm} isoliert werden mussten. Als Eluent wurde dazu ebenso wie zur Extraktion ein Gemisch aus Chloroform und MtBE verwendet. Entsprechend dem Elutionsverhalten der einzelnen Verbindungen variierte jedoch das Verhältnis der beiden Lösungsmittel im isokratischen System, wobei der Anteil an MtBE zwischen 10 und 25 % betrug. Ermittelt wurde dieses für jede Fraktion zunächst mittels analytischer NP-HPLC/UV_{D273nm}.

Nicht alle Verbindungen konnten nach erfolgter präparativer NP-Chromatographie in entsprechender Reinheit (> 90 %, RP-HPLC/UV_{D273nm}) erhalten werden. In diesen Fällen wurde noch eine präparative DC an Kieselgel Si 60 F₂₅₄ angeschlossen.

Aufgrund der umfangreichen Isolierung der Phenololigomere war die Ausbeute der einzelnen Verbindungen nur gering (30 - 130 mg). Die endgültige Strukturaufklärung erfolgte über ¹³C-, ¹H-, IR- sowie UV-Spektroskopie. Dabei konnte wie erwartet mit großer Sicherheit festgestellt werden, dass es sich bei den Verbindungen mit den molaren Massen 230 Da und 336 Da nicht um die Oligomere mit Etherbrücken handelt, sondern um die über Methylengruppen verbundenen Substanzen 5-Hydroxymethyl-2,4'-dihydroxydiphenylmethan (M 230) [2] und 2-(4-Hydroxybenzyl)-4-(4-hydroxymethylphenyl)phenol (M 336) [5] (Abb. 3.56).

Die Methode zur Darstellung von Phenololigomeren und die Ergebnisse der strukturanalytischen Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen sind unter Kapitel 5.3.5 zusammengestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Von den eingangs vorgestellten, von den unterschiedlichen Arbeitsgruppen identifizierten 9 phenolischen Kondensationsprodukten konnten somit 4 Phenololigomere synthetisiert werden. Neben den synthetisierten phenolischen Verbindungen wurden für die vergleichenden Untersuchungen in den Toxizitätstests auch die in Abb. 3.61 dargestellten kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen eingesetzt.

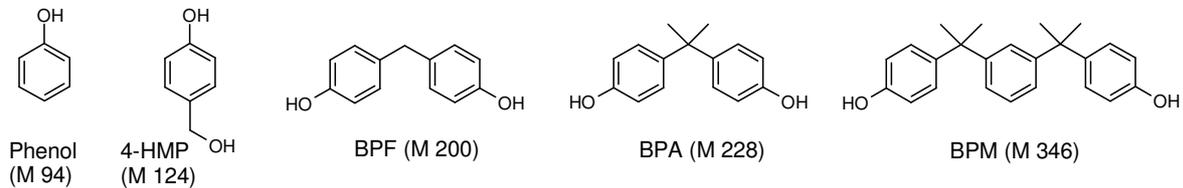


Abb. 3.61: in den Toxizitätstests eingesetzte kommerziell erworbene phenolische Standards

Effekte der phenolischen Verbindungen im Fischembryotest und Neutralrottest

Als Positivkontrolle wurde im Fischembryotest der einzelnen phenolischen Verbindungen das in der DIN 8515-6 T6⁴⁷ vorgeschlagene 3,4-Dichloranilin verwendet. Um den Einfluss des DMSO als Lösungsmittel für die phenolischen Substanzen auf die Fischembryonen so gering wie möglich zu halten, wurden nur 10 µl Untersuchungslösungen bei einem Gesamtvolumen von 1 ml Inkubationsmedium verwendet. In

Abb. 3.62 sind die ermittelten EC₅₀-Werte der einzelnen Substanzen sowie des Reaktionsansatzes der Selbstkondensation nach einer Stunde mit zunehmendem Molekulargewicht dargestellt (Kap. 5.4.1).

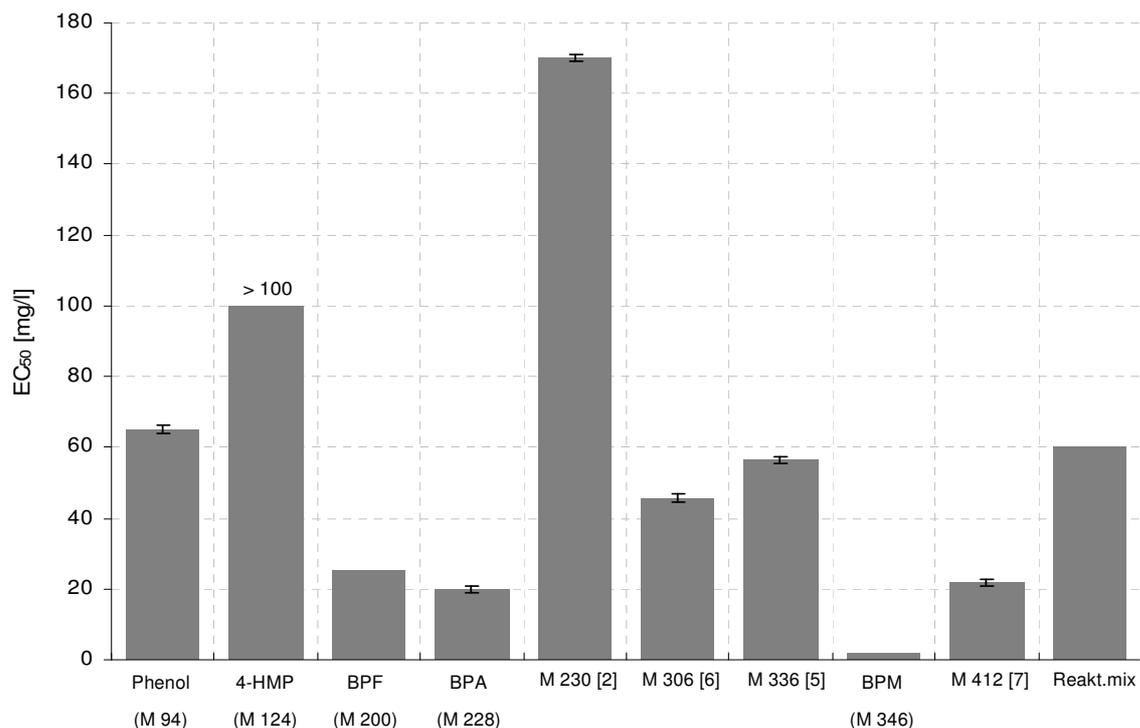


Abb. 3.62: EC₅₀ - Werte der Phenole im Fischembryotest (MW ± SD, n = 1)

Über die Fehlerbalken ist die Standardabweichung für einen Teil der Verbindungen angegeben. Bei einigen Phenolen war dies aufgrund einer zu geringen Messwertanzahl nicht möglich. Die mit den EC_{50} -Werten verbundenen letalen Effekte waren dabei die Koagulation der Eier oder kein Herzschlag bei den Embryonen. Darüber hinaus konnten aber auch subletale Missbildungen beobachtet werden. Hauptsächlich traten diesbezüglich Ödembildung und Wirbelsäulenverkrümmungen auf. Diese embryonalen Veränderungen werden als nicht spezifisch angesehen. In Abb. 3.63 sind die Dosis-Wirkungskurven der synthetisierten (A) und von 3 kommerziellen (B) Phenolen dargestellt. Zwischen der Letalität und dem Logarithmus der eingesetzten Testkonzentration besteht dabei eine sigmoidale Beziehung. Der käuflich erhältliche Standard BPM zeigt dabei einen sehr steilen Kurvenverlauf, d.h. schon geringe Änderungen in der eingesetzten Testkonzentration bewirken eine deutliche Zunahme in der Letalität. Die Dosis-Wirkungskurve der isolierten Verbindung M 306 [6] besitzt im Vergleich dazu einen wesentlich flacheren Anstieg. Die Letalität nimmt somit in Abhängigkeit der Testkonzentration langsamer zu. Die LD_{50} -Werte der unterschiedlichen Substanzen variieren darüber hinaus über knapp 2 Zehnerpotenzen (2 mg/l für BPM, 170 mg/l für M 230 [2]).

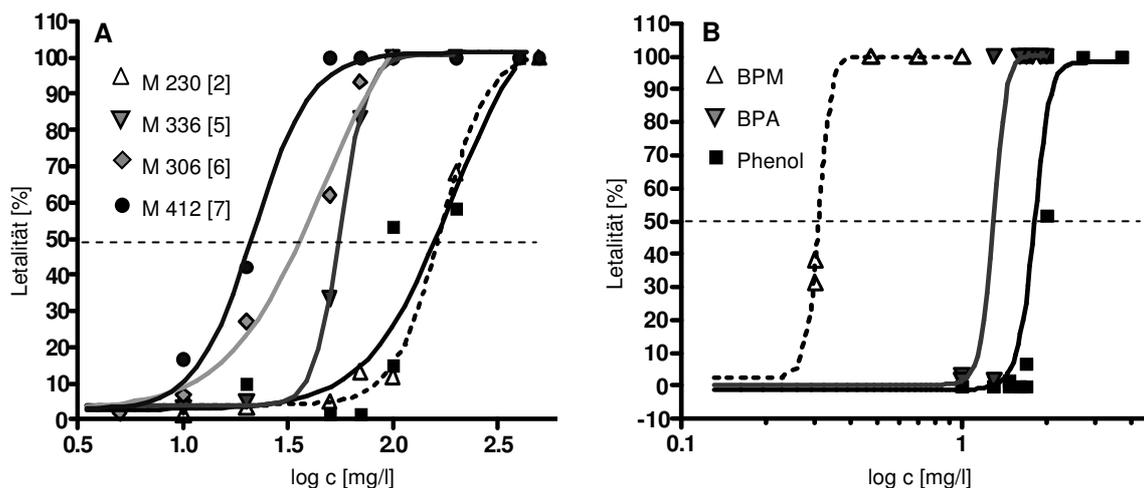


Abb. 3.63: Dosis-Wirkungskurven der synthetisierten Phenole (A) und drei kommerzieller Standards (B)

Die beiden Monomere Phenol und 4-HMP lagen mit EC_{50} -Werten von über 60 mg/l z. T. deutlich über den Ergebnissen der höhermolekularen Oligomere. Für Phenol werden in der Literatur, im Zusammenhang mit einem Vergleich zwischen drei deutschen Laboratorien zur Validierung des Fischembryotest, ähnliche Werte (EC_{50} -Wert \pm SD von $(58,8 \pm 14,1)$ mg/l) beschrieben.⁴⁶ Lange et al.¹⁹⁰ bestimmten für Phenol im Fischembryotest dagegen einen etwas geringeren EC_{50} -Wert von 38 mg/l. Mögliche Erklärungen für die Abweichungen zwischen den Werten können einerseits Unterschiede in der Testdurchführung, andererseits aber auch die Verwendung unterschiedlicher Zebrafischstämme sein.

¹⁹⁰ Lange, M.; Gebauer, W.; Markl, J.; Nagel, R., Comparison of Testing Acute Toxicity on Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 Cytotoxicity as Possible Alternatives to the Acute Fish Test, *Chemosphere* 1995, Vol. 30. No. 11, 2087 - 2102.

Die stärksten Effekte bewirkte das Trimer BPM, hier reichte bereits eine Konzentration von etwa 2 mg/l aus, um 50 % der Fischembryonen letal zu schädigen.

Beim Vergleich strukturähnlicher Verbindungen ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Zwischen den EC_{50} -Werten von BPF und BPA sind nur geringe Unterschiede zu beobachten. Beide Substanzpaare unterscheiden sich nur in ihrer Verbrückung zwischen den aromatischen Ringen. Zum einen erfolgt die Verbindung über Methylen- zum anderen über Propylenbrücken. Bei den Verbindungen, die sich nur um eine zusätzliche Methylolgruppe unterscheiden reagieren die Embryonen auf BPF um etwa das 7fache empfindlicher als auf die Verbindung M 230 [5]. Beim Vergleich der Trimere M 306 [6] und M 336 [5] fällt der Unterschied dagegen wesentlich geringer aus.

Wie aus Abb. 3.62 ersichtlich besteht keine direkte Korrelation zwischen dem Molekulargewicht der phenolischen Verbindungen und den EC_{50} -Werten. Betrachtet man jedoch die Lipophilie der Substanzen, ausgedrückt über den K_{OW} -Wert, so zeichnet sich eine tendenzielle Zunahme der EC_{50} -Wert mit steigender Lipophilie ab (Abb. 3.64 (↘)).

Dies begründet sich möglicherweise mit dem Aufbau des Fischeies. Die dem Dotter aufsitzende Keimscheibe, aus der sich der Embryo entwickelt, ist vom Perivitellinraum umschlossen, welcher wiederum von transparenten Chorion, der Eihülle umgeben wird.⁴⁹ Die zu untersuchenden Substanzen müssen somit mehrere lipophile Membranen durchdringen, um am eigentlichen Wirkungsort Einfluss auf die Embryonalentwicklung nehmen zu können. Je größer dabei der K_{OW} -Wert der phenolischen Verbindungen ist, desto leichter erfolgt die Diffusion in die Membran und desto größer ist ihre Löslichkeit in der Doppellipidschicht. Sie können dort die Eigenschaften der Membranen soweit verändern, dass das Ei koaguliert. Die einzelnen strukturellen Unterschiede wirken sich somit in erster Linie auf die Lipophilie der einzelnen Untersuchungssubstanzen aus. Während zwischen den K_{OW} -Werten von BPA und BPF nur ein Faktor von etwa 4 liegt, ist die Lipophilie von BPM gegenüber der Verbindung M 306 [6] um mehr als das 45fache höher (Tab. 3.10). Die Propylengruppe erhöht demzufolge die Lipophilie einer Substanz stärker als die Methylengruppe.

Tab. 3.10: K_{OW} - und $\log K_{OW}$ -Werte der untersuchten Phenole

	K_{OW}	$\log K_{OW}$
4-HMP	3,98	0,60
Phenol	32,36	1,51
M = 230 [2]	138,04	2,14
BPF	1071,52	3,03
M = 336 [5]	4786,3	3,68
BPA	4365,16	3,64
M = 306 [6]	38911	4,59
M = 412 [7]	1380384,27	6,14
BPM	1778279,41	6,25

Bei den Oligomeren, die sich nur um eine freie Methylolgruppe unterscheiden ist das Verhältnis zwischen den K_{OW} -Werten der jeweiligen Dimere (BPF, M 230 [2]) und Trimere (M 306 [6], M 336 [5]) etwa gleich. Die zusätzliche Hydroxylgruppe erhöht die Polarität um etwa eine Zehnerpotenz.

Der Reaktionsmix liegt mit einem EC_{50} -Wert von 60 mg/l im mittleren Bereich der bestimmten Toxizitätswerte. Er spiegelt die Zusammensetzung an Phenololigomeren nach einer Stunde der Selbstkondensation wieder. Da keine Untersuchungen zu beeinflussenden Effekten der Substanzen untereinander durchgeführt wurden, ist keine Aussage bezüglich eines additiven, nivellierenden oder intensivierenden Effektes der einzelnen enthaltenen Substanzen möglich.

Als Vergleich zu den ermittelten Werten wurden zwei Modellsysteme zur Vorhersage von EC_{50} -Werten herangezogen (Abb. 3.64).

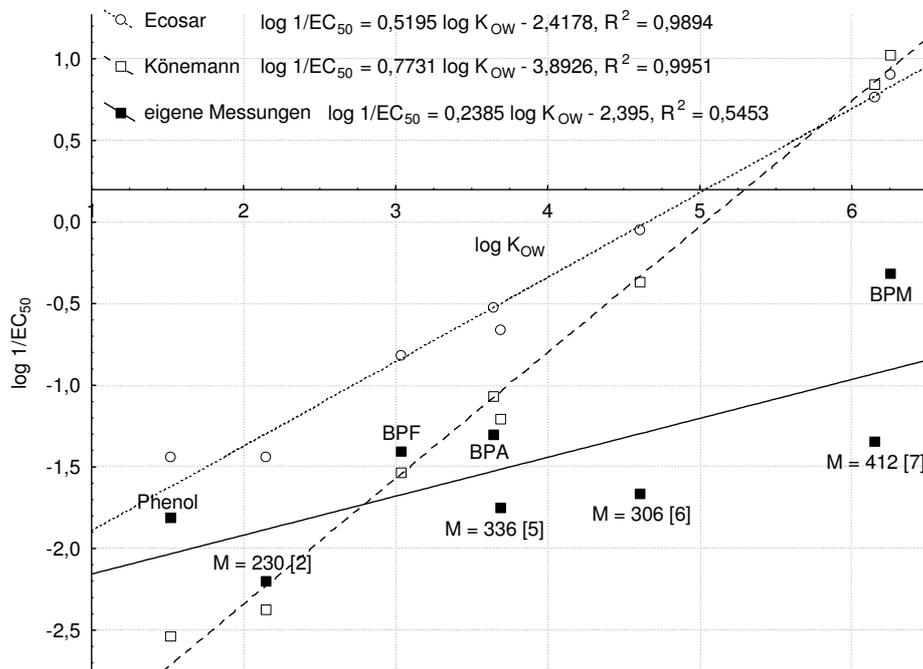


Abb. 3.64: Vergleich der Korrelationen von EC_{50} -Werten und K_{OW} -Werten von Vorhersagewerte zweier Modellsysteme mit den ermittelten Daten im Fischembryotest

Dabei handelt es sich zum einen um das bereits in Kapitel 2.2.2 angesprochene Modell von Könnemann⁶⁰ und zum anderen um das Kalkulationsprogramm ECOSAR, welches mit Hilfe der Struktur der Verbindung sowohl den K_{OW} -Wert als auch den EC_{50} -Wert berechnet.¹⁹¹

Sowohl die Vorhersagewerte des Kalkulationsprogramms als auch die über das Modellsystem von Könnemann⁶⁰ ermittelten Daten ergeben einen deutlich linearen Zusammenhang. Für alle drei Korrelationen wurden die von ECOSAR kalkulierten K_{OW} -Werte zugrunde gelegt. Jedoch ist bereits anhand der unterschiedlichen Steigungen der Geraden der beiden Modellsysteme erkennbar, dass die vorhergesagten EC_{50} -Werte für die einzelnen Phenole auf unterschiedlichen Datensammlungen basieren. Die von ECOSAR kalkulierten Toxizitätswerte basieren auf 78 EC_{50} -Literaturdaten von überwiegend halogenierten Phenolen, bestimmt über den Fischtest mit einer Expositionsdauer von 96 h und werden über die Gleichung $\log LC_{50} = 0.399 - 0.616 \log K_{OW}$ berechnet. Der Regressionskoeffizient wurde zu 0,82 bestimmt. Die Applikation ist dabei auf Phenole mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von kleiner als 7 und einem Molekulargewicht von weniger als 1000 Da beschränkt.

Die 50 Daten von Könnemann⁶⁰ beruhen dagegen auf einen Fischtest mit Guppies und einer Expositionsdauer von 14 h. Hierbei handelt es sich bei den untersuchten Substanzen im Gegensatz zu dem Kalkulationsprogramm nicht um Phenole, sondern um verschiedenste

¹⁹¹ ECOWIN v0.99g; ECOSAR Classes for Microsoft Windows, U.S. Environmental Protection Agency, OPPT – Risk Assessment Division, Gordon Cash and Vince Nabholz, April 2001.

Industriechemikalien wie Chlorbenzole, Alkohole oder Alkylhalogenide. Die Toxizitätswerte werden dabei über die Gleichung $\log(1/LC_{50}) = 0.871 \log K_{OW} - 4.87$ ($r = 0,988$) ermittelt.

Die im Fischembryotest ermittelten Daten streuen im Gegensatz zu den zwei Modellsystemen sehr, wobei man deutlich zwischen den bestimmten Werten für die Standardverbindungen und den selbst synthetisierten Phenololigomeren unterscheiden kann. Alle Werte unterhalb der Geraden sind den synthetisierten Substanzen zuzuordnen. Sie zeigen somit alle eine geringere Toxizität als nach den Vorhersagemodellen zu erwarten gewesen wäre.

Mit den theoretischen Werten gibt es nur bei wenigen Verbindungen eine annähernde Übereinstimmung. Das Programm ECOSAR überschätzt die Toxizität der einzelnen Phenole. Das Modell von Könemann⁶⁰ kalkuliert für die höhermolekularen Verbindungen ebenfalls stärkere Effekte als beobachtet wurden. Die Toxizität der gering molekularen Phenole wird dagegen unterschätzt. Die Abweichungen könnten zum einen auf die unterschiedlichen Testsysteme (Embryo – Fisch), zum anderen aber auch auf die verwendeten $\log K_{OW}$ -Werte zurückgeführt werden. Sowohl Könemann⁶⁰ als auch die Software ECOSAR kalkulieren die K_{OW} -Werte, wobei unterschiedliche Methoden angewendet werden. Die von Könemann⁶⁰ verwendeten $\log K_{OW}$ -Werte werden nach dem System von Rekker et al.¹⁹² berechnet. Jeder $\log K_{OW}$ -Wert setzt sich danach aus unterschiedlichen Termen für die in einer Verbindung enthaltenen Struktureinheiten zusammen. Die von der Software ECOSAR kalkulierten $\log K_{OW}$ -Werte basieren dagegen auf einer von Meylan et al.¹⁹³ entwickelten Methode. Auch hier werden die $\log K_{OW}$ -Werte über die Summierung von Faktoren für die im Molekül enthaltenen einzelnen Atome oder Fragmente sowie entsprechenden Korrekturfaktoren für strukturelle Wechselwirkungen abgeschätzt. Insgesamt stehen dabei Werte für 130 einfache chemische Substrukturen und 235 funktionelle Orientierungen für die Korrelation der $\log K_{OW}$ -Werte zur Verfügung.

Zudem findet man in der Literatur z. T. deutlich voneinander abweichende Werte. So wurde von Kühl et al.¹⁹⁴ für Phenol ein $\log K_{OW}$ -Wert von 1,48 bestimmt. Im Datenblatt von Sigma-Aldrich¹⁹⁵ wird der $\log K_{OW}$ zu 1,46 angegeben und in der Arbeit von Varanasi et al.¹⁹⁶ ist ein Wert von 1,66 aufgeführt. Der von der Software ECOSAR kalkulierte Wert für Phenol beträgt 1,51. Ähnliche Unterschiede in den $\log K_{OW}$ -Werten findet man auch für BPA. Während ECOSAR ein $\log K_{OW}$ von 3,64 kalkuliert, wird von Telscher¹⁹⁷ ein deutlich niedriger Wert von 3,18 angegeben. In einer Studie über BPA des RWS National Institute for Coastal and Marine Management (RWS RIKZ)¹⁹⁸ wird der $\log K_{OW}$ sogar mit einer Spanne von 2,2 – 3,84 angegeben. Als repräsentativster Wert wird

¹⁹² Rekker, R.F., Volume 1: The Hydrophobic fragmental constant. Its Derivation and Application. A Mean of Characterizing Membrane Systems, In: Nauta, W.T.; Rekker, R.F. eds., Pharmacochimistry library, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York 1977.

¹⁹³ Meylan, W.M.; Howard, P.H., Atom/Fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients; J Pharm Sci 1995, Vol. 84, 83 - 92.

¹⁹⁴ Kühl, D.W.; Christensen, J., Determination of Kow Values for a Series of Aryl Glucuronides, Bull Environ Contam Toxicol 1999, Vol. 63, No. 1, 109 - 116.

¹⁹⁵ Sigma-Aldrich, Material safety data sheet - phenol, Version 1.5, <http://www.glue.umd.edu/~choi/MSDS/Sigma-Aldrich/PHENOL.pdf>, 03.11.2007.

¹⁹⁶ Varanasi, U.; Stein, J.E.; Nishimoto, M., chapter 4: Biotransformation and Disposition of PAH in Fish, In: Varanasi, U. eds., Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment, 1st edition, CRC Press 1989.

¹⁹⁷ Telscher, M., Schicksal von 4-Nonylphenol und Bisphenol A im System Boden/Klärschlamm bei der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung, http://www.walt.uwf.rwth-aachen.de/ageesa/themen/telscher/telscher_d.html, 03.11.07.

¹⁹⁸ Groshart, D.C.; Okkermann, P.C.; Pijenburg, A.M.C.M., Chemical studie on Bisphenol A, Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ, Report RIKZ/2001.027.

dabei ein $\log K_{OW}$ von 3,4 genannt. In der Arbeit von Verliefe et al.¹⁹⁹ findet man dagegen für BPA einen $\log K_{OW}$ von 3,32. Es ist somit verständlich, dass je nach verwendeten $\log K_{OW}$ -Wert, die mit den einzelnen QSAR-Systemen vorhergesagten EC_{50} -Konzentrationen unterschiedliche Werte annehmen.

Auch die Streuung der im Test ermittelten EC_{50} -Konzentrationen lässt sich u. a. mit den verwendeten $\log K_{OW}$ -Werten erklären. So stellen die Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten in jeden Fall nur eine Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse zwischen Membranlipiden und Zellwasser dar. Der Verteilungskoeffizient ist dabei keine Konstante. Vielmehr ist er abhängig von den vorliegenden Systemparametern wie pH-Wert und der Art und Konzentration der im Medium enthaltenen Ionen.⁶²

Abweichungen von den Vorhersagewerten der QSAR-Systeme, die auf narkotisch wirkenden Substanzen basieren, sind auch aufgrund von möglichen spezifischen Wirkmechanismen der Verbindungen in den Zellen erklärbar. Das heißt, die Reaktion am Wirkungsort erfolgt nicht unspezifisch mit verschiedenen molekularen Strukturen der Zelle, sondern mit einem speziellen Rezeptor. Bezüglich BPA (EC_{50} 20 mg/l) kann jedoch anhand des minimalen Abstandes des Toxizitätswertes zu BPF (EC_{50} 25 mg/l) vermutet werden, dass dessen ausgeprägte östrogene Eigenschaft gegenüber der narkotischen Wirkung in den Hintergrund tritt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Wirkmechanismen auf die Höhe der im Fischembryotest ermittelten EC_{50} -Werte einen Einfluss haben.

Im Vergleich zu den Embryonen sind die adulten Fische ähnlich empfindlich gegenüber Phenol. Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde von Razani et al.²⁰⁰ im akuten Fischtest mit dem Zebrafisch ein LC_{50} von 24,9 ppm bestimmt. Auch die in einer Sammlung von LC_{50} -Werten für Phenol im Fischtest von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmten Werte in einer Spanne von 8,9 bis 67,5 mg/l (\bar{x} = 30,4 mg/l) liegen im gleichen Konzentrationsbereich.²⁰¹

Allgemein ist ein Vergleich zwischen den Werten im Fischembryotest mit denen des akuten Fischtests aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen schwierig. Für Bisphenol A wurde im akuten Fischtest ein LC_{50} von 4,6 mg/l bestimmt.²⁰² Dies entspricht einem Viertel des im Fischembryotest bestimmten Wertes.

Effekte der phenolische Verbindungen im Neutralrottest

Im Neutralrottest wurden die Zellen 24 h in den Lösungen der phenolischen Substanzen bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, der Gehalt an fötalem Kälberserum (FKS) betrug dabei 1 %. Des Weiteren enthielt das Medium der Zellen kontinuierlich 0,8 % des Antibiotikums Gentamycin. Auch in diesem Toxizitätstest enthielten die Inkubationslösungen 1 % DMSO, über welches die Proben in

¹⁹⁹ Verliefe, A.; Van Vliet, N.; Amy, G.; Van der Bruggen, B.; van Dijk, J.C., A Semi-Quantitative Method for Prediction of the Rejection of Uncharged Organic Micropollutants with Nanofiltration, water practice and Technol 2006, Vol. 1, No. 4, Proceedings IWA World Water Congress, Beijing.

²⁰⁰ Razani, H.; Nanba, K.; Murachi, S., Acute Toxic Effect of Phenol on Zebrafish *Branchydanio rerio*, Bull Japan Soc Sci Fish 1986, Vol. 52, No. 9, 1547 - 1552.

²⁰¹ Clements, R.G., Estimation toxicity of industrial chemicals to aquatic organisms using structure-activity relationships, Environmental Effects Branch Health and Environmental Review Division Office of Pollution Prevention and Toxics U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460, 1996.

²⁰² Alexander H.C.; Dill, D.C.; Smith L.W.; Guiney P.D.; Dorn P., Bisphenol A: Acute aquatic toxicity. Environ Toxicol Chem 1988, Vol. 7, 19 - 26.

unterschiedlicher Konzentration eingesetzt wurden. Die Negativkontrolle erfolgte demzufolge mit 1 %igem DMSO. Für die Positivkontrolle erwies sich BPA als geeignet.

Im Zellttest konnten tendenziell ähnliche Ergebnisse ermittelt werden wie im Fischembryotest, wobei in der Regel die Hep-G2 Zellen empfindlicher reagieren als die HT-29 Zellen (Abb. 3.65, Kap. 5.4.2). Ursache dafür ist möglicherweise die in den Hep-G2 Zellen noch vorhandene metabolische Restaktivität.

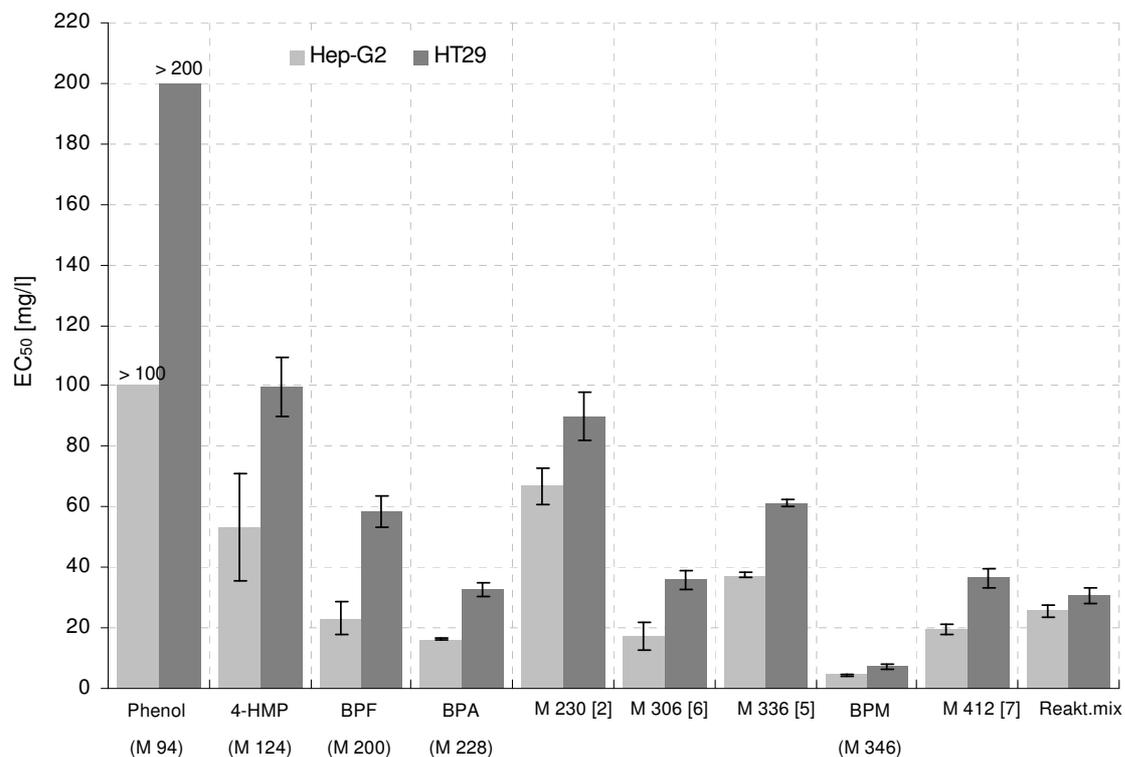


Abb. 3.65: EC₅₀ - Werte der Phenole im Neutralrottest, (MW ± SD, n = 3)

Diese umfasst sowohl die Synthese als auch die Sekretion wichtiger Plasmaproteine, wie z. B. Albumin, Fibrinogen, Transferrin oder verschiedene Glycoproteine.²⁰³ Durch die Einwirkung der Testsubstanzen auf das metabolische System ist es möglich, dass sich die Enzymaktivität erhöht, wodurch wiederum die Glucuronidierung oder Sulfatation anderer Verbindungen verstärkt ablaufen kann. So beobachteten Dawson et al.²⁰⁴ an Hep-G2 Zellen bei der Einwirkung von 4-Methylcholanthren eine 36fache Steigerung der Glucuronidierung sowie eine 7fach höhere Sulfatation von 7-Ethoxycoumarin.

Durch die Metabolisierung von Xenobiotika können diese gegenüber ihrer unmetabolisierten Form also geringer aber auch verstärkt toxisch wirken.

²⁰³ Knowles, B.B.; Howe, C.C.; Aden, D.P., Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen, Science 1980, Vol. 209, 497 - 499.

²⁰⁴ Dawson, J.R.; Adams, D.J.; Wolf, C.R., Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2, FEBS Lett 1985, Vol. 32, No. 2, 219 - 222.

Im Gegensatz zum Fischembryotest war im Zelltest Phenol die Substanz mit den höchsten EC_{50} -Werten. Bei den Hep-G2 Zellen konnte bis 100 mg/l und bei den HT-29 Zellen sogar bis 200 mg/l kein Effekt nachgewiesen werden. In der Arbeit von Jover et al.²⁰⁵ wurde für Phenol ein IC_{50} -Wert von $(1,4 \pm 0,2)$ g/l für Hep-G2 Zellen bestimmt. Die Endpunktbestimmung im Test erfolgte dabei zum einen über die Bestimmung der intrazellulären Laktat-Dehydrogenase-Aktivität und zum anderen über den MTT-Test. Dieser nach Michael Tilson Thomas (MTT) benannte Zytotoxizitätstest beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und ist hauptsächlich abhängig von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums.²⁰⁶ Die geringe Empfindlichkeit der Hep-G2 Zellen gegenüber Phenol bestätigten auch Pedersen et al.²⁰⁷. Sie konnten unterhalb von 1,9 g/l keinerlei Effekte beobachten, wobei auch hier der MTT-Test verwendet wurde. Der Unterschied zwischen den Werten der einzelnen Arbeitsgruppen ist möglicherweise auf den Gehalt an FKS zurückzuführen, welches den Zellen, zusätzlich zu den im Medium enthaltenen Stoffen, als Nährstoffquelle dient. Jover et al.²⁰⁵ verwendeten einen Anteil von 10 % FKS, Pedersen et al.²⁰⁷ sogar 15 %. Die Abhängigkeit der EC_{50} -Werte vom verwendeten FKS-Gehalt wird mit den adsorptiven Eigenschaften der im FKS enthaltenen Proteine in Verbindung gebracht.²⁰⁸ Dadurch verringert sich der frei auf die Zellen einwirkende Anteil an Testsubstanz. Die ermittelten EC_{50} -Werte sind somit in der Regel umso höher, je größer der Gehalt an FKS im Kulturmedium der Zellen ist.

Während für Phenol im untersuchten Konzentrationsbereich keine toxischen Effekte beobachtet werden konnten, liegen die EC_{50} -Werte für das Trimer BPM analog zum Fischembryotest deutlich unter 10 mg/l.

Das zur Synthese der Phenololigomeren verwendete Monomer 4-HMP ist in seiner Toxizität vergleichbar mit dem synthetisierten Dimer M 230 [2].

Für die Verbindungen BPA, das Trimer M 306 [6] und das Tetramer 412 [7] konnten sowohl bei den Hep-G2 Zellen als auch der HT-29 Zellen ähnliche Toxizitätswerte bestimmt werden. Entsprechende Ergebnisse für BPA erhielten auch Jondeau et al.²⁰⁹. Sie untersuchten zehn verschiedene Wasserkontaminanten, einschließlich BPA mit drei subletalen Zytotoxizitätstests an der humanen Hep-G2-Zelllinie. Die Inkubationszeit betrug jeweils 20 h bei einem FKS-Gehalt von 5 %. Mit dem RNA-Synthese Test, bei welchem der Einbau des radioaktiven Nucleosids ^3H -Uridins in die zelluläre RNA gemessen wird, wurde für BPA ein IC_{50} von 16,8 mg/l (0,074 mM) bestimmt. Im Alamar blue assay, in dem die Zellvitalität über den pinkfarbenen und fluoreszierenden Farbstoff Resorufin ermittelt wird, betrug der IC_{50} für BPA 54,7 mg/l (0,24 mM). Als drittes Testsystem wurde

²⁰⁵ Jover, R.; Ponsoda, X.; Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J., Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines: correlation between *in vitro* data and human lethal concentrations, *Toxic in Vitro* 1994, Vol. 8, No. 1, 47 - 54.

²⁰⁶ Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/MTT>, (01.11.2007).

²⁰⁷ Pedersen, G.; Brynskov, J.; Saermark, T., Phenol Toxicity and Conjugation in Human Colonic Epithelial Cells, *Scand J Gastroenterol* 2002, Vol. 37, 74 - 79.

²⁰⁸ Mittag, N.; Förster, S.; Hoppe, S.; Simat, T.J.; Sehr, A.; Renz, S.; Vobach, M.; Kammann, U., Bioassay Guided Analysis of Migrants from Can Coatings, *J Verbr Lebensm* 2006, Vol. 1, 345 - 353.

²⁰⁹ Jondeau, A.; Dahbi, L.; Bani-Estivals, M.H.; Chagnon, M.C., Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assay in human HepG2 cell line using water contaminants, *Toxicology* 2006, Vol. 226, 218 - 228.

der ATP-Biolumineszenz-Test gewählt. Bei dieser ATP-Nachweismethode kommt es zur Oxidation von Luziferin unter Verbrauch von ATP, wobei die Reaktion durch Luziferase, einem Enzym der Amerikanischen Feuerfliege katalysiert wird. Die Lichtemission dieser Luciferase-Reaktion ist direkt proportional der ATP-Konzentration.²¹⁰ Für BPA wurde über diese Endpunktbestimmung ein IC_{50} von 50,2 mg/l (0,22 mM) bestimmt. Anhand der IC_{50} -Werte (in mM) beurteilten Jondeau et al.²⁰⁹ BPA im RNA-Test als hoch toxisch in den beiden anderen Testsystemen als leicht toxisch. Sie teilten dabei die Substanzen nach ihren IC_{50} -Werten in drei Toxizitätslevels ein. Verbindungen mit einem IC_{50} von < 0,1 mM wurden als hoch toxisch eingestuft. Im Bereich von 0,1 bis 10 mM gelten die Substanzen als toxisch. Bei Werten über 10 mM liegt dagegen nur noch eine schwache Toxizität vor. Nach dieser Einteilung sind sowohl die Dimere BPA und M 306 [6] als auch BPM und das Tetramer M 412 [7] als hoch toxisch im Neutralrottest an den Hep-G2-Zellen anzusehen (Tab. 3.11). Für Phenol, welches unter 100 mg/l keine toxischen Effekte zeigte, ist die Einordnung in die beschriebenen Toxizitätslevels nicht genau möglich. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann Phenol maximal als toxisch angesehen werden. Alle anderen untersuchten Phenole sind nach ihren EC_{50} -Werten als toxisch einzustufen.

Tab. 3.11: Toxizitätslevels der untersuchten Substanzen im Neutralrottest für die Hep-G2 Zellen nach Jondeau et al.²⁰⁹

	EC_{50} [mM] Hep-G2	Toxizitätslevel
Phenol (M 94)	> 1,06	max. toxisch
4-HPM (M 124)	0,43	toxisch
BPF (M 200)	0,12	toxisch
BPA (M 228)	0,07	hoch toxisch
M 230 [2]	0,29	toxisch
M 306 [6]	0,06	hoch toxisch
M 336 [5]	0,11	toxisch
BPM (M 346)	0,01	hoch toxisch
M 412 [7]	0,05	hoch toxisch

Im Neutralrottest ist der EC_{50} -Wert des Reaktionsmixes im Gegensatz zum Fischembryotest tendenziell geringer als die einzelnen Toxizitätswerte der Verbindungen. Auch für dieses Testsystem kann keine Aussage bezüglich des Anteils der einzelnen isolierten Phenololigomere an der Gesamtoxizität des Reaktionsmixes getroffen werden.

Eine entsprechende Abhängigkeit der einzelnen EC_{50} -Werte von der Lipophilie der Substanzen ist auch bei den Ergebnissen des Neutralrottests zu beobachten (Abb. 3.66).

Die Streuung der Werte um die Gerade ist jedoch etwas weniger ausgeprägt als bei den Werten des Fischembryotests.

²¹⁰ Heinrich, C., Pharmakologische Charakterisierung der Wirkungen von Glukokortikoiden auf die Atmungskette und die ATP-Synthese in adrenokortikotropen Hypophysenzellen (AtT 20), Philipps-Universität-Marburg, Dissertation 2005.

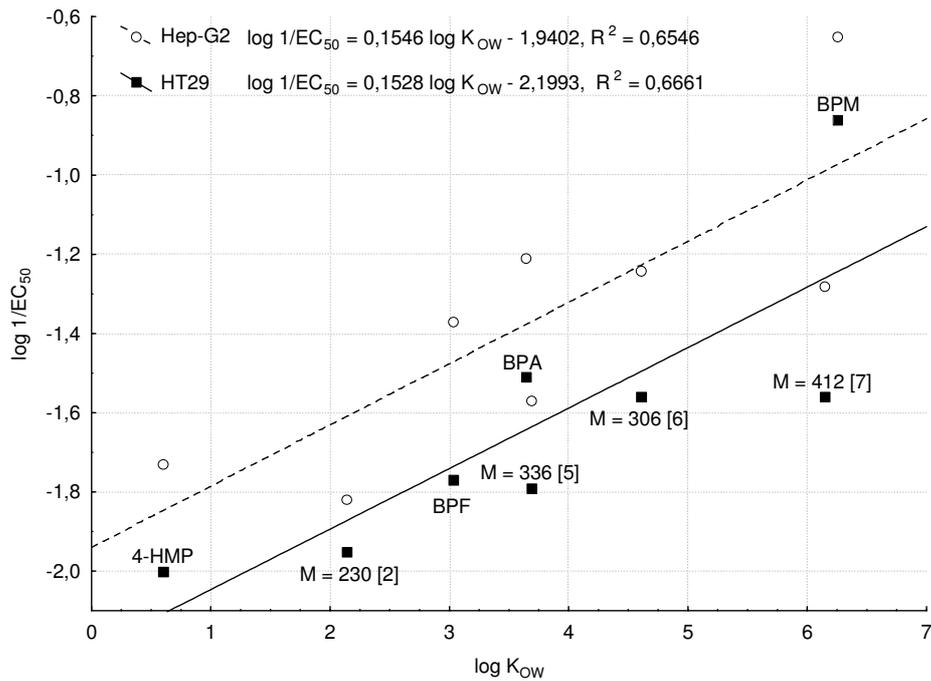


Abb. 3.66: Korrelation der ermittelten EC₅₀-Werte im Neutralrottest mit dem K_{OW}-Werten der Verbindungen

Fischembryotest und Neutralrottest im Vergleich

In Abb. 3.67 sind die ermittelten EC₅₀-Werte des Fischembryotests und des Neutralrottests im Vergleich gegeneinander aufgetragen. In einigen wenigen Fällen ist die Toxizität der beiden Testsysteme gut vergleichbar. Wobei dies nicht jeweils auf beide Zelllinien zutrifft.

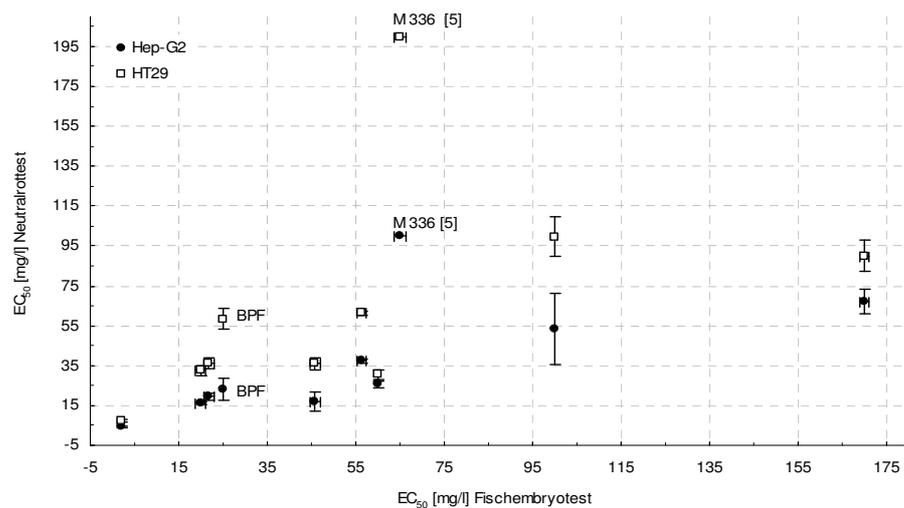


Abb. 3.67: Vergleich der EC₅₀-Werte im Fischembryo- und Neutralrottest

Für das Trimer M 336 [5] gibt es z.B. eine gute Übereinstimmung zwischen den Fischembryotest (EC₅₀ 56,5 mg/l) und den Ergebnis der HT-29 Zelllinie (EC₅₀ 61,3 mg/l). Die Hep-G2 Zellen reagieren dagegen wesentlich empfindlicher (EC₅₀ 37,3 mg/l). Bei BPF sind dagegen die Werte

des Fischembryotests (EC_{50} 25 mg/l) mit denen der Hep-G2 Zellen (EC_{50} 23,2 mg/l) vergleichbar. Die EC_{50} -Konzentration für die HT-29 Zellen beträgt dagegen mehr als das Doppelte (58,3 mg/l). Eine Aussage bezüglich einer besseren Übereinstimmung der Ergebnisse des Fischembryotests mit den Werten der einen gegenüber der anderen Zelllinie ist daher nicht möglich. Im Allgemeinen zeigen alle drei Testsysteme, bezüglich der untersuchten Phenole untereinander etwa die gleiche Reihenfolge in den ermittelten EC_{50} -Konzentrationen.

Molekulargewichtsfractionen eines Phenolharzes im Fischembryotest

Die Untersuchungen erfolgten am Phenolharz 3. Dazu wurde das Harz mittels SEC-UVD fraktioniert, das Lösungsmittel entfernt und die Rückstände in 200 μ l DMSO aufgenommen. Sowohl diese Stammlösungen der einzelnen Fraktionen als auch jeweils eine 1:5 Verdünnung wurden im Fischembryotest eingesetzt. Analog zum Fischembryotest der Einzelsubstanzen wurden von den Proben 10 μ l bei einem Gesamtvolumen von 1 ml Inkubationsmedium eingesetzt. Im Fischembryotest wurden somit die in Tab. 3.12 aufgeführten Konzentrationen verwendet. Um auszuschließen, dass das zur Fraktionierung mittels SEC verwendete THF Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung hat, wurde dies ebenfalls fraktioniert und analog der Phenolharzfraktionen als Blindwert im Test eingesetzt. Die Fraktionierung erfolgte dabei jedoch über den gesamten Molekulargewichtsbereich.

Tab. 3.12: Konzentrationen der Molekulargewichtsfractionen im Fischembryotest

Fraktionen	Konzentration 1 [mg/l]	Konzentration 2 [mg/l]
0 - 200	38,5	7,7
200 - 400	125,5	25,1
400 - 600	86,5	17,3
600 - 800	45	9
800 - 1000	21	4,2

In Abb. 3.68 sind die Ergebnisse des Fischembryotests, aufgeschlüsselt in normal entwickelte Embryonen sowie in Embryonen mit letalen und nicht letalen Missbildungen und die verwendete Konzentration im Test dargestellt. Embryonen, die sowohl letale als auch nicht letale Veränderungen aufwiesen, wurden als tot gewertet. Die Summe der untersuchten Fischeier ergibt somit für jede Molekulargewichtsfraction immer 100 %. Als signifikant werden alle Ergebnisse über 10 % angesehen.

Sehr deutlich ist, dass die phenolischen Verbindungen mit einem Molekulargewicht zwischen 200 und 600 Da die stärksten Effekte bewirkten. Substanzen mit geringerer molarer Masse sowie über 600 Da riefen dagegen keine oder nur nicht letale Veränderungen bei den Embryonen hervor. Während es bei den weniger toxischen Fraktionen 0 - 200 Da und 600 - 800 Da signifikante Unterschiede zwischen den zwei verwendeten Konzentrationsstufen gibt, sind bei den Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 800 – 1000 Da diesbezüglich keine Differenzen zu verzeichnen.

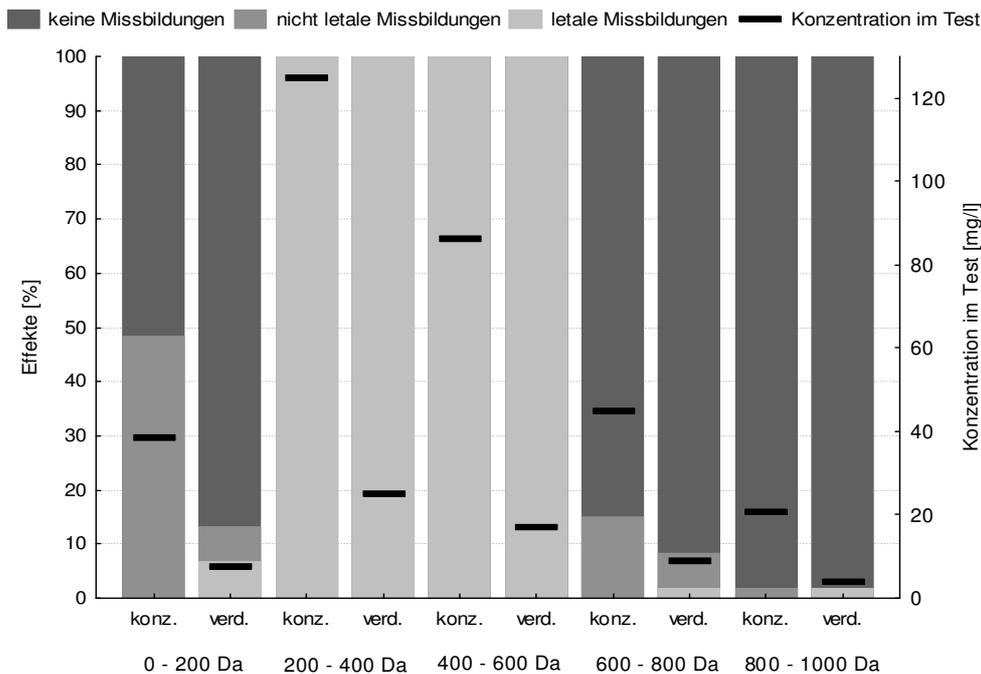


Abb. 3.68: Ergebnisse des Fischembryotest der einzelnen Molekulargewichtsfractionen in zwei Konzentrationsstufen

Ursache dafür ist möglicherweise, dass die Substanzen in diesem hohem Molekulargewichtsbereich aufgrund ihrer Größe nicht mehr in der Lage sind die Eihülle des Embryonen zu durchdringen und somit nicht zum Ort ihrer spezifischen Wirkungen gelangen. So wird eine mögliche verminderte Aufnahmerate durch die Struktur der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembranen bei großen Molekülen von einer Kettenlänge $> 9,5 \text{ \AA}$ beschrieben.⁶² Im Bereich niedrigen Molekulargewichts (0 – 200 Da) kann ein möglicher Grund für die geringen toxischen Effekte die erhöhte Polarität der Testsubstanzen sein. Durch die geringe Lipophilie der Substanzen besitzen sie eine geringe Löslichkeit in den Membranen, wodurch es zu einer verminderten Bioakkumulation kommt.⁶² Andererseits ist auch eine schnelle Metabolisierung und Elimination der niedermolekularen phenolischen Verbindungen denkbar. So beobachteten Kasokat et al.⁴ die Metabolisierung sowohl von Phenol als auch o-Kresol zu ihren Glucuroniden und Sulfaten im Zebrafisch.

Zur näheren Betrachtung der beiden effektivsten Fraktionen (200 - 400 Da und 400 - 600 Da) sind die, bei diesen Substanzen beobachteten Missbildungen in Abb. 3.69 und Abb. 3.70 dargestellt. Die koagulierten Eier werden dabei gesondert betrachtet. Der prozentuale Anteil der übrigen letalen und nicht letalen Missbildungen wurde bezogen auf die Anzahl der nicht koagulierten Eier bestimmt.

In der konzentrierten Lösung der Fraktion 200 - 400 Da bewirkten die phenolischen Verbindungen, dass alle Fischeier koagulierten (Abb. 3.69). Aber auch bei der Inkubation in 5facher Verdünnung erfolgte bei keinem Embryo eine normale Entwicklung. Es traten vielmehr bei allen Embryonen in gleich Weise multiple Fehlentwicklungen auf, so dass sich bis zum Testende (Expositionszeit 48 h) kein lebensfähiger Organismus entwickelte.

3 Ergebnisse und Diskussion

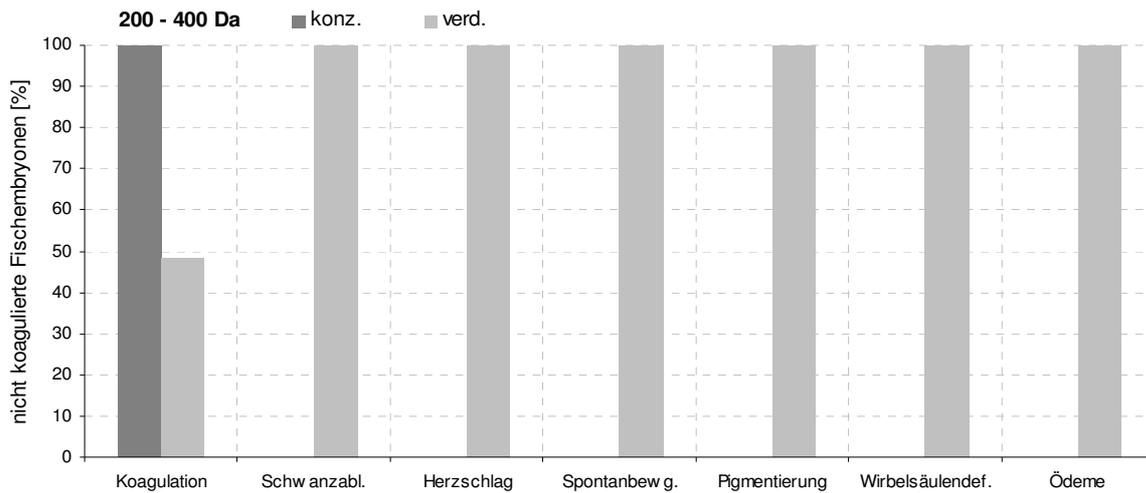


Abb. 3.69: individuelle Missbildungen in der Fraktion 200 - 400 Da

In der Fraktion 400 - 600 Da sind ebenfalls alle Embryonen letal geschädigt, die Schädigungen sind aber weniger ausgeprägt als im Molekulargewichtsbereich zwischen 200 - 400 Da (Abb. 3.70).

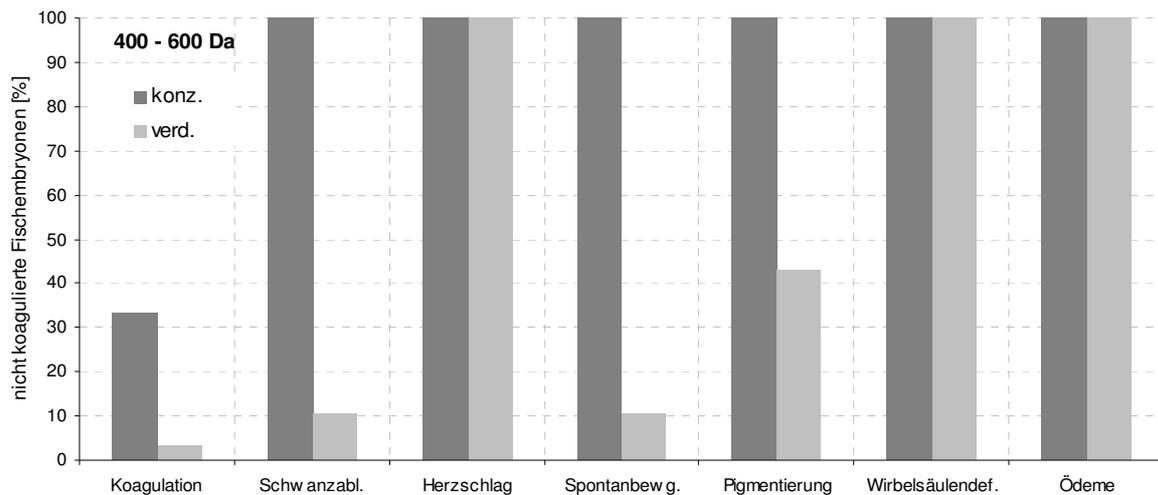


Abb. 3.70: individuelle Missbildungen in der Fraktion 400 - 600 Da

Die Effekte der konzentrierten Lösung sind vergleichbar mit denen der Verdünnung von Fraktion 200 - 400 Da. In der Inkubationslösung der 5fachen Verdünnung sind dagegen bereits keine Embryonen mehr signifikant koaguliert. Bei Testende ist jedoch ebenfalls bei allen Embryonen als letale Missbildung kein Herzschlag zu verzeichnen. Bei den nicht letalen Missbildungen treten dagegen vor allem Wirbelsäulendeformationen und Ödembildungen auf.

Nach den von Bachmann⁵² und Nagel et al.⁵³ beschriebenen Stadien der embryonalen Entwicklung des Zebraäbrblings kann man, vor allem anhand der Testergebnisse der Inkubation in der 5fach-Verdünnung der Fraktion 400 - 600 Da vermuten, dass sich die phenolischen Verbindungen stark entwicklungsverzögernd auf die Embryonen auswirkten. Kein Embryo zeigt Schäden bezüglich der Augen- und der Somitananlagen, deren Ausbildung in einer recht frühen Phase der

Embryonalentwicklung erfolgt. Die Ablösung des Schwanzes und die Ausführung von Spontanbewegungen sind bei etwa 90 % der Embryonen beobachtbar. Beide Entwicklungsstadien müssten etwa 24 h nach der Befruchtung erkennbar sein. Während zudem normal entwickelte Embryonen zum Zeitpunkt der Endpunktbestimmung eine vollständige Pigmentierung zeigen, wiesen diese im Test nur ca. 45 % der Embryonen auf. Ein Herzschlag, der in der Regel nach 48 h regelmäßig ist, konnte bei keinem Embryo beobachtet werden. Bezüglich der Pigmentierung wird auch in der Literatur ein Zusammenhang zwischen diesem Effekt und einer verzögerten embryonalen Entwicklung beschrieben.²¹¹ Bei dieser zeitlichen Betrachtung der im Test vorliegenden, gegenüber der normalen Embryonalentwicklung kann etwa eine Entwicklungsverzögerung von 24 h abgeschätzt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen getesteten Fraktionen liegt die Vermutung nahe, dass die deutlich stärkeren Effekte der Verbindungen zwischen 200 - 600 Da auf wesentlich höher konzentrierte Testlösungen zurückzuführen sind. Betrachtet man jedoch in Abb. 3.68 die Stapelplots der konzentrierten Inkubationsansätzen der Fraktionen 0 - 200 Da, 600 - 800 Da und 800 - 1000 Da mit den Ergebnissen der 5fach verdünnten Testlösungen der Phenole 200 - 400 Da und 400 - 600 Da so liegen vergleichbare Konzentrationen vor. Es ist somit davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte auf dem Molekulargewicht der phenolischen Verbindungen beruhen, unabhängig von der Konzentration im Test.

In den für die einzelnen Molekulargewichtsfractionen beobachteten Effekten, spiegeln sich die Ergebnisse der untersuchten verschiedenen Phenololigomeren wieder. In beiden Untersuchungen zeigten niedermolekulare Verbindungen wie Phenol und 4-HMP bzw. die Fraktion zwischen 0 - 200 Da nur geringe toxische Wirkungen. Bei Substanzen höheren Molekulargewichts waren dagegen sowohl bei den Einzelverbindungen als auch bei den Fraktionen stärkere Effekte zu beobachten. Bereits 25,1 mg/l bzw. 17,3 mg/l der Fraktionen 200 - 400 Da und 400 - 600 Da waren in den Tests ausreichend, um alle Embryonen letal zu schädigen. Aus Abb. 3.63 ist es möglich für die untersuchten Einzelsubstanzen die Konzentrationen abzuschätzen, bei denen im Test 100 % der Embryonen letal geschädigt werden. Entsprechend dieser Dosis-Wirkungskurven ist erkennbar, dass mit Ausnahme von BPM und BPA für die einzelnen Oligomeren Konzentrationen von etwa 50 mg/l für M 412 [7] und ca. 80 mg/l für M 306 [6] und M 336 [5] bis über 300 mg/l für Phenol und M 230 [2] notwendig wären, um diese Letalitätsrate zu erreichen. Für BPM konnte ein EC₁₀₀ von etwa 2,3 mg/l und für BPA von ca. 30 mg/l abgeschätzt werden.

²¹¹ Weterhagen, M., The zebrafish book, 1995, Institute of Neuroscience, University of Oregon und Herrmann, K. Effects of the anticonvulsant drug Valproic acid and related substances on the early development of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Toxic in Vitro 1993, Vol. 7, No. 1, 41 - 54 zitiert in Ensenbach, U., Embryonic Development of Fish - a Model to Assess the Toxicity of Sediments to Vertebrates, Fresenius Envir Bull 1998, Vol. 7, 531 - 538.

3.2 Epoxidharze als Bestandteil von Coatings

3.2.1 Derivatisierung mit Cysteamin

Auf Grundlage der rechtlichen Regelungen liegen zur Bestimmung von Epoxidverbindungen bisher nur amtliche Methoden vor, die auf die Erfassung von BADGE und BADGE·2HCl sowie BFDGE und NOGE und dessen Hydroxy- und Chlorderivaten ausgerichtet sind.^{118, 212} Andere Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen bleiben dabei unberücksichtigt. Im Folgenden war das Ziel die Entwicklung einer Summenmethode zur Erfassung aller in einem Migrat enthaltenen Substanzen mit reaktionsfähigen Oxirangruppen. Die Epoxidverbindungen sollten zunächst derivatisiert und anschließend aus dem Derivatisierungsansatz entfernt werden. Die qualitative und quantitative Bestimmung der Epoxidverbindungen wurde über den Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach der Probenaufarbeitung angestrebt.

Die Wahl des Derivatisierungsreagenzes erfolgte auf Grundlage der von Petersen¹³¹ beobachteten sehr schnellen und leichten Reaktion der Oxirangruppen mit Thiolen. Neben dieser im Molekül erwünschten Thiolgruppe sollte das Derivatisierungsreagenz eine weitere reaktive Gruppe enthalten, welche eine anschließende Isolierung des Derivates aus dem Reaktionsansatz ermöglicht. Dafür sollte bevorzugt ein Ionenaustauschermaterial eingesetzt werden. Als mögliche Reagenzien wurden auf Grundlage dieser Voraussetzungen Thioglycolsäure, das Natriumsalz der 2-Mercaptoethansulfonsäure und Cysteamin ausgewählt. Wobei für die Entfernung der Derivate der beiden erstgenannten Reagenzien ein Anionenaustauscher und für die Cysteaminderivate ein Kationenaustauscher verwendet werden sollte. In Vorversuchen erfolgte mit allen drei Derivatisierungsreagenzien, welche im großen Überschuss eingesetzt wurden, eine vollständige Umsetzung der Epoxidverbindungen eines Coatingsextraktes. Die anschließende Festphasenextraktion zur Abtrennung der Derivate war jedoch weder mit Thioglycolsäure noch mit 2-Mercaptoethansulfonsäure erfolgreich. Nur die Cysteaminderivate konnten mittels Kationenaustauscher vollständig aus dem Derivatisierungsansatz entfernt werden. Es erfolgte somit anschließend eine umfangreiche Optimierung der Derivatisierungs- und Extraktionsmethode mit Cysteamin als Derivatisierungsreagenz (Abb. 3.71).

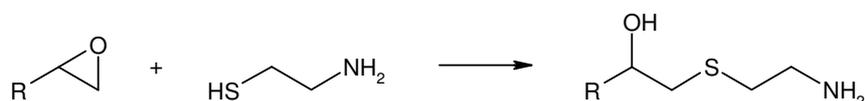


Abb. 3.71: Derivatisierung von Oxirangruppen mit Cysteamin

²¹² DIN EN 15137, Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln - Bestimmte Epoxidderivate, die Beschränkungen unterliegen - Bestimmung von NOGE und dessen Hydroxy- und Chlorderivaten, DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Juni 2006, Beuth Verlag, Berlin

Optimierung mittels one-factor-at-a-time - Methode

Zur Orientierung, welche Faktoren die Derivatisierung beeinflussen, wurden zunächst nach der herkömmlichen one-factor-at-a-time-Methode ausgehend von einem festgelegten Niveau, verschiedene Einflussfaktoren jeweils einzeln variiert, während die anderen konstant gehalten wurden. Bezüglich der Zielgröße fiel die Wahl auf das Cysteaminderivat von BADGE-H₂O. Die Einflussfaktoren pH-Wert, Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und Cysteaminkonzentration wurden in entsprechenden Schritten verändert. Für das Ausgangsniveau wurden eine Cysteaminlösung mit einer Konzentration von 20 g/l und deren natürlicher pH-Wert von 10,1 gewählt. Des Weiteren erfolgte die Reaktion bei 50 °C für 30 min. Es wurde stets eine BADGE-H₂O Lösung mit einer Konzentration von 5 ppm im Volumenverhältnis 1 : 1 mit der Cysteaminlösung umgesetzt.

Variation des pH-Wertes: Der Einfluss des pH-Wertes auf die Vollständigkeit der Derivatisierung wurde zwischen 5,0 und 10,1 untersucht und jeweils mit 0,4 N Ameisensäure eingestellt. Anhand Abb. 3.72 ist zu erkennen, dass die Umsetzung sehr stark vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Mit steigendem pH-Wert steigt die Umsetzungsrate des Standards. Bei einem pH-Wert ≥ 9 erfolgt eine vollständige Derivatisierung.

Variation der Reaktionszeit: Die Abhängigkeit der Derivatisierung von der Reaktionszeit ist ebenfalls in Abb. 3.72 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der Einfluss der Reaktionszeit im untersuchten Bereich zwischen 5 und 30 min wesentlich geringer ist als beim pH-Wert. Schon nach 5 min ist über 50 % der Ausgangssubstanz derivatisiert und nach 15 min ist die Umsetzung bereits vollständig.

Variation der Reaktionstemperatur: Auch die Reaktionstemperatur wurde in Hinblick auf eher mildere

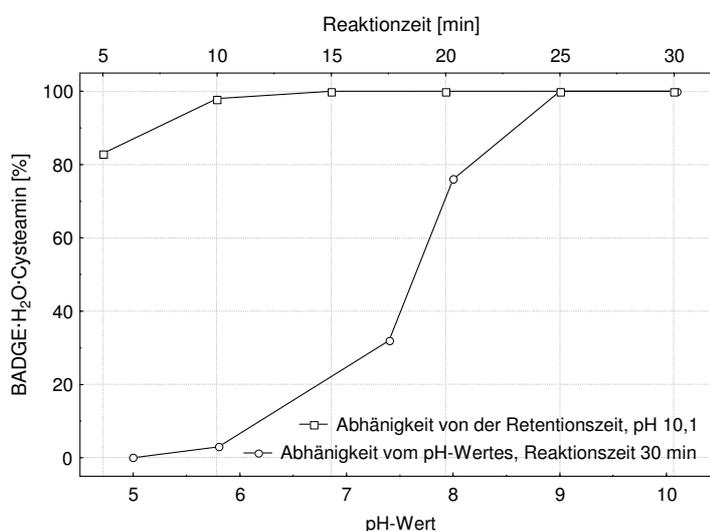


Abb. 3.72: Abhängigkeit der Konzentration an BADGE-H₂O-Cysteamin von der Retentionszeit und dem pH-Wert

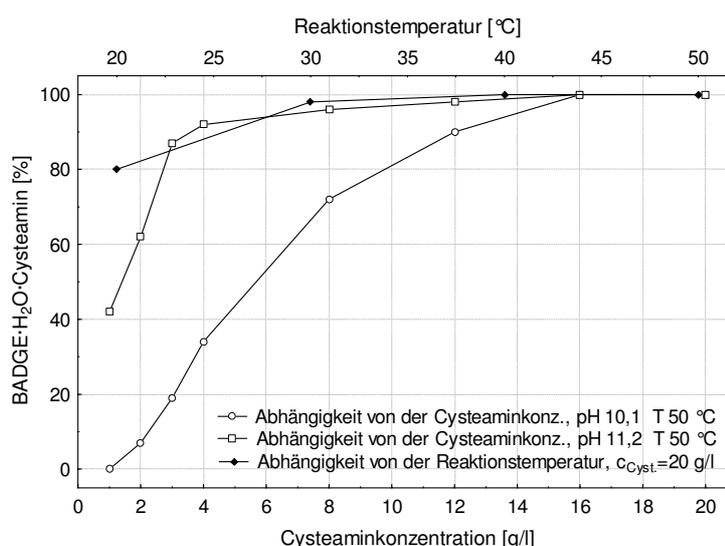


Abb. 3.73: Abhängigkeit der Konzentration an BADGE-H₂O-Cysteamin von der Reaktionstemperatur und der Cysteaminkonzentration

Reaktionsbedingungen variiert (Abb. 3.73). Während bei RT und 30 °C noch keine vollständige Derivatisierung beobachtet werden konnte, war bei 40 °C BADGE·H₂O vollständig umgesetzt.

Variation der Cysteaminkonzentration: Die Cysteaminkonzentration wurde zwischen 1 und 20 g/l variiert. Dies entspricht einem molaren Überschuss an Cysteamin gegenüber BADGE·H₂O von etwa 930 - 18600. Diese hohe Konzentration an Cysteamin ist aufgrund der Oxidationsanfälligkeit und der damit verbundenen Bildung des Disulfids Cystamin notwendig. Da bei den geringeren Cysteaminkonzentration der pH-Wert unter 10,1 sank, wurde zur Einstellung des pH-Wertes bei diesen Versuchen eine 0,25 mM Triethylaminlösung verwendet. In Abb. 3.73 ist deutlich zu sehen, dass die verwendete Cysteaminkonzentration bei einem pH 10,1 einen großen Einfluss auf die Umsetzung des Standards hat. Jedoch erst bei einer Cysteaminkonzentration von 16 g/l (etwa 15000facher molarer Überschuss) ist eine 100 %ige Derivatisierung zu verzeichnen. Cysteamin besitzt zwei pK_s - Werte: pK_{s1} 8,35 und pK_{s2} 10,81. Aufgrund des höher dissoziierten Anteils an Cysteamin im Bereich des zweiten pK_s-Wertes war anzunehmen, dass bei einem pH-Wert um 11 die Derivatisierungsreaktion schon bei einer geringeren Konzentration an Cysteamin vollständig abläuft. Der entsprechende pH-Wert wurde hierfür mit 10 mM Triethylaminlösung eingestellt. Der Kurvenverlauf in Abb. 3.73 für den pH-Wert 11,2 bestätigt diese Theorie. Bei diesem pH-Wert wird bereits bei einer Konzentration von 4 g/l ein Anteil an derivatisierten BADGE·H₂O von über 90 % erreicht. Es reduziert sich somit, durch Anhebung des pH-Wertes um eine pH-Einheit, die zur vollständigen Derivatisierung notwendige Cysteaminkonzentration auf ein Viertel der ursprünglichen Menge.

Anhand der Variation der Cysteaminkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten ist die Beschränktheit der one-factor-at-a-time - Methode sehr deutlich zu erkennen. Durch die Variation nur einer Variablen bleiben jegliche Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen unbeachtet. Das eigentlich mehrdimensionale Problem wird auf ein eindimensionales reduziert. Es sollte daher nur zur Orientierung für einen nachfolgenden statistischen Versuchsplan dienen.

Optimierung der Derivatisierung mittels statistischer Versuchsplanung

Mit Hilfe eines statistischen Versuchsplanes ist es möglich mit minimalem Aufwand maximale Erkenntnisse über ein System, mit umfangreichem Verständnis der Zusammenhänge zwischen Einflussfaktoren und Zielgrößen zu erhalten. Mathematische Modelle ermöglichen dabei aus den Messergebnissen eine Regressionsfunktion zu bestimmen, welche im gesamten Versuchsraum gültig ist. Diese lässt die Berechnung von Funktionswerten an beliebigen Punkten im Versuchsraum zu. Die Bewertung der einzelnen Einflussgrößen bezüglich ihrer Wirkung auf die Zielgröße erfolgt dabei vor dem Hintergrund, dass die ermittelten Messwerte der Zielgröße, nicht auf Schwankungen durch Störfaktoren oder Messfehler basieren, sondern vielmehr auf die Wirkung der im Versuchsplan variierten Einflussfaktoren zurückzuführen sind.²¹³ Um Einflüsse und Fehler durch solche zufälligen Störgrößen zu erkennen und zu vermeiden ist eine sorgfältige Kontrolle der Messergebnisse notwendig. Dies erfolgt in der Regel über Mehrfachmessungen und

²¹³ Adam, M., Statistische Versuchsplanung und Auswertung, Fachhochschule Düsseldorf, Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik, http://tw.w.fh-duesseldorf.de/DOCS/FB/MUV/adam/downloads/skript_fb4/doe/doe_vorlesung_ss04.pdf (12.11.2007).

Betrachtung von Streuungsmaßen, wobei die Ermittlung der Versuchsstreuung meist nur an einer charakteristischen Stelle im Versuchsraum erfolgt.

Der Umfang eines statistischen Versuchsplanes hängt von der Anzahl an Einflussfaktoren k und den gewählten Versuchstufen n , das heißt den unterschiedlichen Werten, welche die Einflussgrößen annehmen, ab. Die Menge an Versuchen für einen vollständigen Versuchsplan ergibt sich aus n^k . Die Versuchstufen haben somit einen höheren Einfluss auf die Zahl der durchzuführenden Experimente als die Einflussfaktoren. Mit der Anzahl an Versuchstufen steigt jedoch auch der Informationsgewinn. Während man bei der Verwendung von 2 Stufen nur Erkenntnisse über lineare Abhängigkeiten erhält, werden bei 3 Stufen auch quadratische Zusammenhänge erkennbar.

Im Folgenden sollen 3^k - Pläne näher betrachtet werden. Zur Verallgemeinerung und Vereinfachung der Versuchsplanung und -auswertung werden die natürlichen Werte der Faktorstufen im transformierten Koordinatensystem $(-1, 0, +1)$ angegeben. Der Zentralpunkt des Planes liegt stets im Zentrum des Koordinatensystems $(0, 0, \dots, 0)$. Zur Verringerung des Auswerteaufwandes sollten außerdem die beiden Stufenabstände eines Faktors vom Zentralpunkt (0) äquidistant sein.²¹⁴

Für einen vollständigen 3^3 - Faktorversuchsplan sind 27 Versuche nötig, welche sich graphisch als Würfel darstellen lassen (Abb. 3.74). Ein Versuchspunkt liegt im Zentrum des Würfels und wird als 0. Sphäre bezeichnet. Die 1. Sphäre bilden die Flächenmittelpunkte (6 Versuchspunkte), die auf einer inneren Kugeloberfläche liegen und einen äquidistanten Abstand zum Zentrum aufweisen.

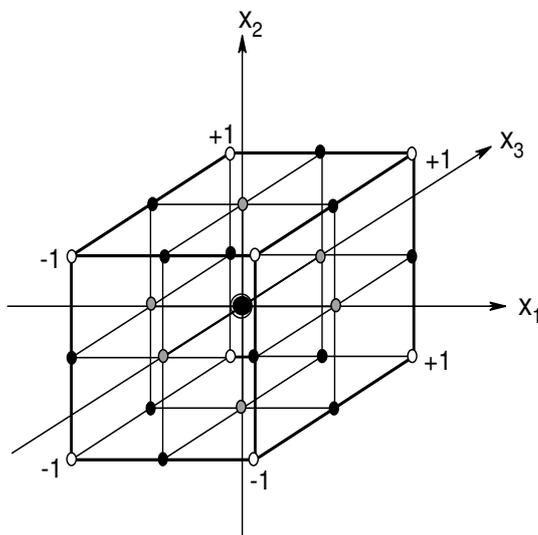


Abb. 3.74: vollständiger 3^3 -faktorieller Versuchsplan Anlehnung an Petersen²¹⁵

Die Kantenmittelpunkte (12 Versuchspunkte) die auf einer zweiten konzentrischen Kugeloberfläche liegen, bilden die 2. Sphäre. Die 8 Würfecken (8 Versuchspunkte) liegen auf der äußersten konzentrischen Kugeloberfläche und bilden die 3. Sphäre.²¹⁵ Bei vollständigen 3^k Versuchsplänen mit $k > 3$ verteilen sich die durchzuführenden Experimente auf den Zentralpunkt (0. Sphäre) und k Kugeloberflächen, d. h. k - Sphären. Werden alle Experimente eines vollständigen Versuchsplanes durchgeführt, ergibt sich ein hoher Grad an Überbestimmtheit, d.h. die Anzahl an Versuchspunkten ist größer als die Anzahl an interessierender Regressionskoeffizienten K (Abb. 3.75).

²¹⁴ Scheffler, E., Statistische Versuchsplanung und -auswertung - eine Einführung für Praktiker, 3., neu bearb. und erw. Aufl., Dt. Verl. für Grundstoffindustrie, Stuttgart 1997.

²¹⁵ Petersen, H., Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung, Bd. II, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech 1991.

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4AB + b_5AC + b_6BC + b_7ABC$$

Abb. 3.75: allgemeine Form der linearen Regressionsfunktion bei 3 Einflussfaktoren, b_n = Regressionskoeffizienten

Im Falle von Polynomen 2. Grades lässt sich die Anzahl an notwendigen Regressionskoeffizienten durch folgende Gleichung ermitteln:

$$K = \frac{(k + 1) \cdot (k + 2)}{2} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Ein Maß für die Überbestimmtheit ist der Redundanzfaktor. Er ist der Quotient aus der Anzahl an Versuchen N und der zu bestimmenden Regressionskoeffizienten K :

$$\text{Redundanzfaktor} = \frac{N}{K} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Je größer der Redundanzfaktor ist, desto größer ist der Grad an Überbestimmtheit. In der Regel werden praxisnahe Redundanzfaktoren mit Werten nahe 1 angestrebt. Bei einem vollständigen 3^4 -Faktorplan werden 5 Sphären mit insgesamt 81 Versuchen besetzt. Bei 15 zu bestimmenden Koeffizienten K beträgt der Redundanzfaktor überdurchschnittliche 5,4. Daraus resultiert in der Regel ein Bestreben zur Reduzierung vollfaktorieller Versuchspläne. Es besteht dabei die Möglichkeit Pläne um komplette Sphären, Teilsphären oder um komplette Sphären und Teile von anderen Sphären zu reduzieren. Es ist jedoch auf den Erhalt der Orthogonalität der restlichen auszuführenden Versuche zu achten, d.h. es muss eine unkorrelierte Schätzung aller Koeffizienten β des Polynoms gewährleistet sein.²¹⁶ Dies wird erreicht, wenn die Haupteffekte der zu untersuchenden Faktoren nicht vermengt werden und somit die Faktoreffekte unabhängig voneinander bestimmbar sind.

Reduziert man nach Fry²¹⁷ einen 3^4 -Faktorversuchsplan durch Streichen der 1. Sphäre und 3. Sphäre (insgesamt 40 Experimente) so erhält man einen Plan mit $N = 41$ Versuchen, woraus sich für ein quadratisches Regressionsmodell mit 15 Koeffizienten ein Redundanzfaktor von 2,7 ergibt, der immer noch ein hohes Maß an Überbestimmtheit aufweist. Box und Behnken²¹⁸ konnten durch weitere Reduzierung statistische 3^k Versuchspläne mit praxisrelevanten Redundanzfaktoren entwickeln. Die volle Orthogonalität wird dabei durch Einbeziehung einer bestimmten Anzahl an Wiederholungsversuchen im Zentralpunkt aufrechterhalten. Eliminiert man in dem oben erhaltenen 3^4 -Plan mit $N = 41$ Versuchen zusätzlich auch die 4. Sphäre (16 Versuchspunkte), so erhält man einen Versuchsplan mit 27 Versuchspunkten. Die verbleibenden Versuchspunkte der 2. Sphäre entsprechen den Flächenmittelpunkten im vierdimensionalen Versuchsraum. Es ergibt sich nun im quadratischen Regressionsmodell bei 27 Versuchen und 15 Koeffizienten ein akzeptabler Redundanzfaktor von 1,8.²¹⁵ Die drei Wiederholungsversuche im Zentralpunkt dienen unter

²¹⁶ Kleppmann, W., Taschenbuch Versuchsplanung - Produkte und Prozesse optimieren, 4., überarb. Aufl., Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München, Wien 2006.

²¹⁷ Fry, R.E., Finding new Fractions of Factorial Experimental Designs, Technomet 1961, Vol. 3, 359 - 370.

²¹⁸ Box, G.E.P.; Behnken, D.W., Some new Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables, Technomet 1960, Vol 2, 455 - 475.

anderem zur Bestimmung der versuchsbedingten Streuung der Messwerte. Die berechnete Versuchsvarianz steht dabei im direkten Zusammenhang mit der Signifikanz der Einflussfaktoren auf die Zielgröße. Um zufällige Fehler infolge inhomogener Versuchsbedingungen möglichst klein zu halten, werden die verbleibenden Versuche in 3 Blöcke eingeteilt und zudem in jedem Block in zufälliger Reihenfolge (randomisiert) durchgeführt.

Zur weiteren Optimierung der Derivatisierungsmethode mit Cysteamin wurde entsprechend den Einflussgrößen der one-factor-at-a-time - Methode ein solcher 4-faktorieller 3-stufiger Box-Behnken Versuchsplan verwendet. Die drei Stufen der einzelnen Einflussfaktoren wurden in Anlehnung an die bereits durchgeführten Versuche gewählt. Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf die Derivatisierung. Unter pH 8 fand jedoch keine wesentliche Umsetzung von BADGE·H₂O statt. Es wurde sich daher für die 3 Stufen: pH 8, 9,5 und 11 entschieden. Die Einstellung der verschiedenen pH-Werte erfolgte mit 0,4 N Ameisensäure bzw. mit 0,4 N NaOH. Die Reaktionszeit wurde zwischen 10, 30 und 50 min variiert. Bezüglich der Reaktionstemperatur fiel die Wahl auf die Werte RT, 35 und 50 °C. Als niedrigste Cysteaminkonzentration wurde 4 g/l gewählt, da bei pH 11,2 bei dieser Konzentration bereits eine Ausbeute an BADGE·H₂O-Cysteamin Derivat von über 90 % erreicht werden konnte. Mit äquidistantem Abstand erfolgten die Untersuchungen des Weiteren mit Cysteaminkonzentrationen von 10 und 16 g/l. In Abb. 3.76 ist das Paretoogramm für die einzelnen Einflussfaktoren in ihrer linearen sowie quadratischen Abhängigkeit auf die Zielgröße BADGE·H₂O-Cyst. dargestellt. Für die Beurteilung der Signifikanz der Einflussfaktoren auf die Ausbeute an Cysteaminderivat wurde ein Signifikanzniveau von 95 % ($p = 0,05$) gewählt. Mit Ausnahme der Temperatur, die nur eine lineare Abhängigkeit zeigt, üben alle Faktoren sowohl einen signifikanten linearen als auch quadratischen Einfluss auf die Umsetzung von BADGE·H₂O aus. In allen Fällen ergibt die lineare Regression eine bessere Anpassung als die quadratische. Die gebildeten Blöcke zeigen keine signifikanten Unterschiede, d.h. alle übrigen Versuchsbedingungen neben den zu untersuchenden Variablen können als konstant angenommen werden.

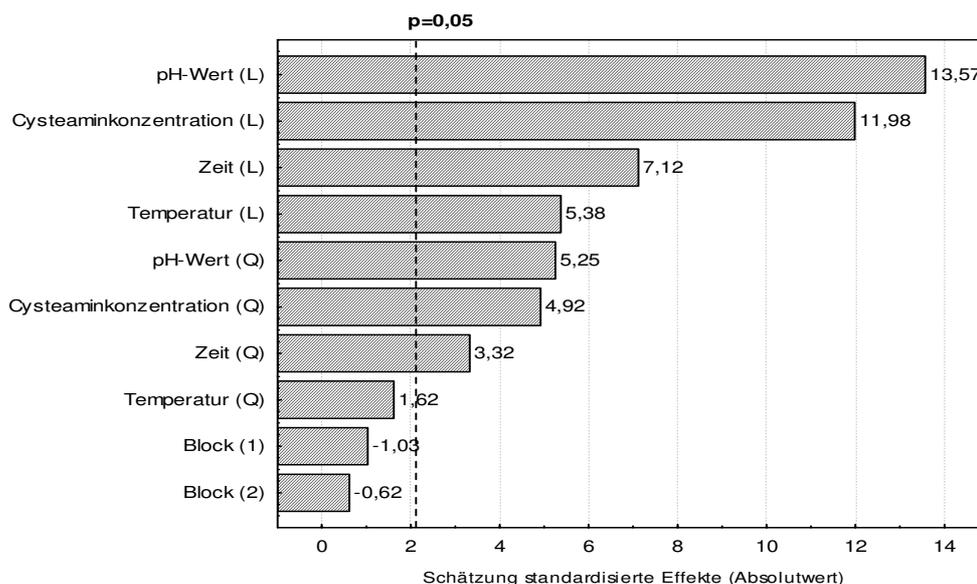


Abb. 3.76: Paretoogramm der standardisierten Effekte für die Zielgröße BADGE·H₂O-Cyst.

Signifikante lineare Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Einflussfaktoren konnten nicht bestimmt werden. Für die Ermittlung von quadratischen Wechselwirkungen war der Umfang des Datenmaterials zu gering. In Abb. 3.77 ist die Abhängigkeit der Derivatisierung von BADGE·H₂O von den beiden stärksten Einflussgrößen (pH-Wert und Cysteaminkonzentration) dreidimensional in einem Flächenplot über den gesamten experimentellen Versuchsraum einschließlich der einzelnen Messpunkte dargestellt.

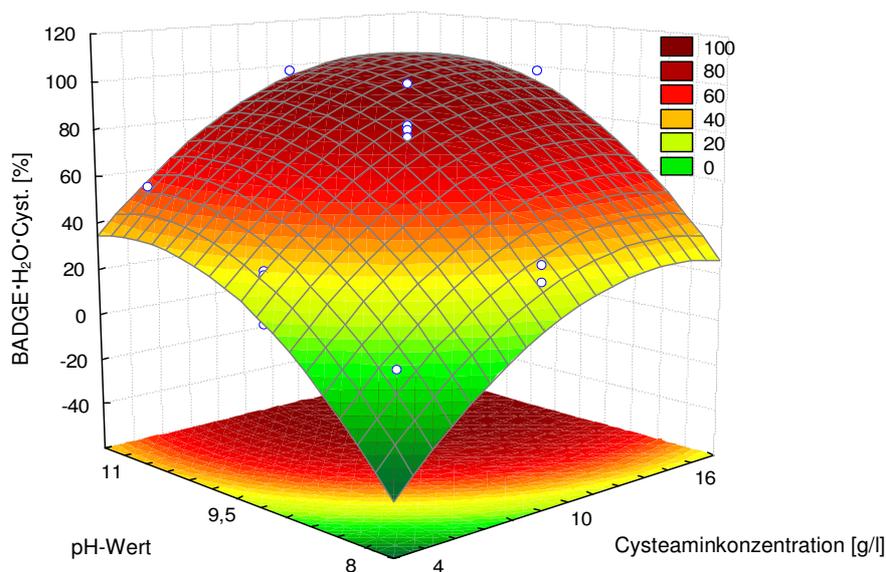


Abb. 3.77: 3D-Flächenplot für die Zielgröße BADGE·H₂O·Cyst. in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Cysteaminkonzentration (Temperatur 35 °C; Zeit 30 min)

Die verbleibenden Faktoren (Temperatur und Zeit) werden in der Darstellung auf der mittleren Stufe konstant gehalten. Mit zunehmender Cysteaminkonzentration sowie pH-Wert steigt die Umsetzung an BADGE·H₂O. Alle weiteren möglichen 3D-Flächenplots sollen an dieser Stelle nicht aufgeführt werden, da sie ähnliche Ergebnisse zeigen, d.h. mit zunehmenden Werten steigt der prozentuale Anteil des Derivates BADGE·H₂O·Cyst..

Für die weitere Optimierung der Derivatisierungsmethode wurde sich an den Versuchen orientiert, deren Bedingungen eine etwa 100 %ige Ausbeute an BADGE·H₂O·Cyst. lieferte. Bei 6 von 27 Versuchen konnte eine Derivatisierung von über 95 % beobachtet werden (Abb. 3.78).

Es wurde sich im Folgenden für die Derivatisierung mit den Bedingungen pH 11, 30 min, 50 °C und 10 g/l Cysteamin entschieden, welche z. T.

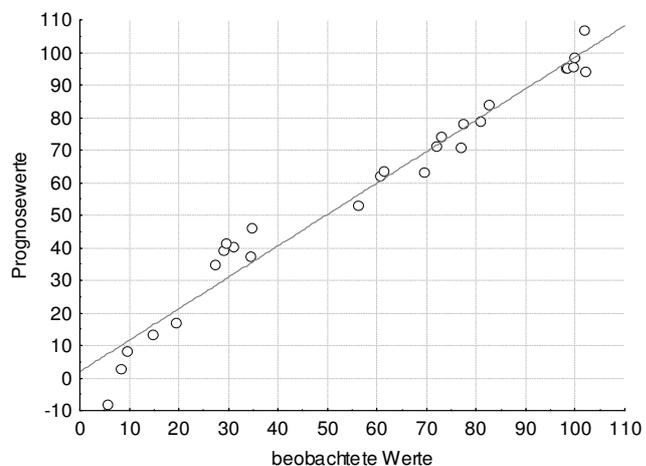


Abb. 3.78: Vergleich der beobachteten Werte mit den Prognosewerten, gebildetes BADGE·H₂O·Cyst.-Derivat in %

auch erfolgreich auf weitere epoxidierten Verbindungen übertragen werden konnten. Hydrochlorierte Verbindungen, wie BADGE·H₂O·HCl und BADGE·2HCl, waren unter diesen Reaktionsbedingungen jedoch nicht beständig (Abb. 3.79). Die beim Abbau der hydrochlorierten BADGE-Derivate ablaufende Reaktion ist bereits in Abb. 2.10 dargestellt. Aufgrund des basischen Milieus kommt es unter Eliminierung von Salzsäure zur Ausbildung des Oxiranringes, welcher im Folgenden ebenfalls mit Cysteamin zu entsprechenden Produkten reagiert. Da somit in der Probe vorhandene hydrochlorierte Substanzen die Anwesenheit von epoxidierten Verbindungen vortäuschen, waren weitere Veränderungen an den Reaktionsbedingungen notwendig.

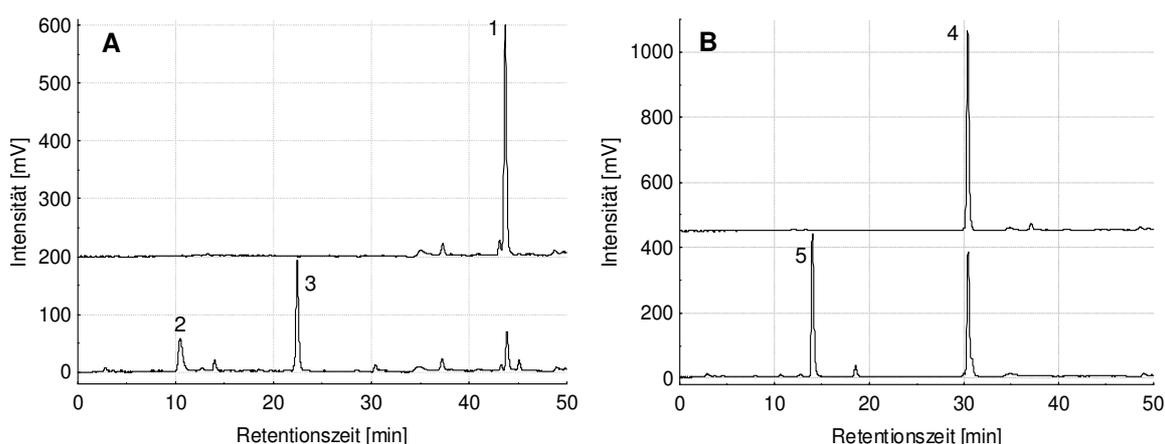


Abb. 3.79: Abbau der hydrochlorierten Verbindungen BADGE·2HCl (A) sowie BADGE·H₂O·HCl (B) während der Derivatisierung mit Cysteamin; Reaktionsbedingungen: pH 11, 30 min, 50 °C, 10 g/l Cysteamin; 1...BADGE·2HCl, 2...BADGE·2Cyst., 3...BADGE·2H₂O, 4...BADGE·H₂O·HCl, 5...BADGE·H₂O·Cyst.; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 65 min 85 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Durch Reduzierung des pH-Wertes auf 9,5 bei gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionszeit auf 50 min konnte die Umsetzung der hydrochlorierten Verbindungen wesentlich verringert, jedoch nicht vollständig verhindert werden. Von BADGE·H₂O·HCl setzte sich noch immer etwa 10 % und von BADGE·2HCl rund 20 % zu den entsprechenden Derivaten um. Es war somit eine weitere Verringerung des pH-Wertes auf pH 9 notwendig. In einer weiteren Versuchsreihe bei pH 9 und unterschiedlichen Temperatur/Zeit-Kombinationen konnte beobachtet werden, je milder die Reaktionsbedingungen sind (niedrige Temperatur sowie kurze Reaktionszeit), desto geringer war der Umsatz der hydrochlorierten Verbindungen. Jedoch verringerte sich damit auch gleichzeitig die Umsetzung der epoxidierten Substanzen. Zu diesem Zeitpunkt der Optimierung stellten folgende Reaktionsbedingungen die optimalen Bedingungen für die Derivatisierung von epoxidierten Verbindungen dar: pH 9, Cysteaminkonzentration 10 g/l, 50 min und 60 °C. Die Umsetzung der chlorierten BADGE-Derivate konnte dabei weiter auf Werte unter 10 % gesenkt werden.

Da im weiteren Verlauf der Arbeit mit Migraten und Harzen gearbeitet werden sollte, wurde aufgrund der zu erwartenden erhöhten Lipophilie der Verbindungen ein hoher Gehalt an organischem Lösungsmittel im Reaktionsansatz angestrebt. In Abb. 3.80 sind die Chromatogramme der Standards nach Derivatisierung in Reaktionsansätzen mit einem Wasseranteil von 20 - 50 % in Ethanol im Vergleich zum nicht derivatisierten Standardmix dargestellt.

Es ist deutlich zu sehen, dass ein Wasseranteil von 20 - 40 % in Ethanol für eine vollständige Derivatisierung nicht ausreicht. In allen drei Ansätzen ist sowohl das Zwischenprodukt BADGE·1Cyst. aber auch BADGE·H₂O noch klar erkennbar. Dagegen werden bei gleichem Volumenverhältnis organisches Lösungsmittel zu Wasser die verwendeten Standards nahezu vollständig derivatisiert. Die Polarität des Reaktionsansatzes spielt somit eine nicht unwesentliche Rolle. Dies erklärt sich mit der Solvatation der bei der basischen Ringöffnung entstehenden Alkoholatgruppe durch polare Lösungsmittel und der damit verringerten Aktivierungsenergie für die nukleophile Substitution des Cysteamins.⁹

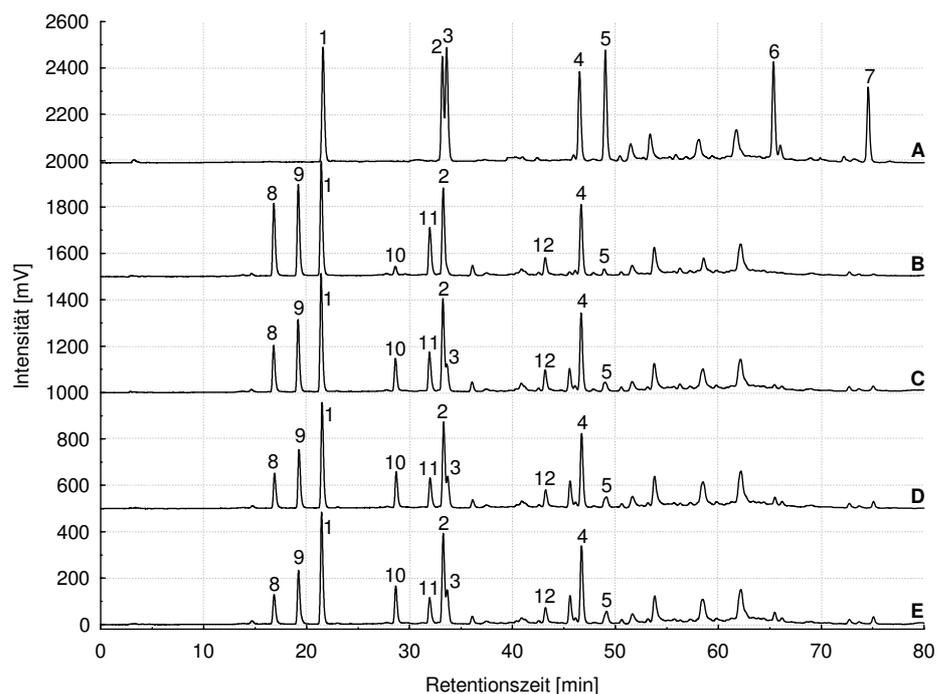


Abb. 3.80: Derivatisierung der Standardverbindungen mit unterschiedlichem Wasseranteil (B...50 % H₂O, C...40 % H₂O, D...30 % H₂O, E...20 % H₂O) im Reaktionsansatz im Vergleich zum unbehandelten Standardmix (A), (B)1...BADGE·2H₂O, 2...BADGE·H₂O·HCl, 3...BADGE·H₂O, 4...BADGE·2HCl, 5...BADGE, 6...BADGE(n=1), 7...BADGE(n=2), 8...BADGE·2Cyst., 9...BADGE·H₂O·Cyst., 10...BADGE·1Cyst., 11...BADGE(n=1)·2Cyst., 12...BADGE(n=2)·2Cyst.; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 75 min 95 % B, 85 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Bei der Übertragung dieser Versuche auf ein niedermolekulares Epoxidharz (Nr. 2) zeigt sich zum einen wiederum der unterschiedliche Fortschritt der Derivatisierung zum anderen offenbarte sich jedoch ein weiterer Effekt des unterschiedlichen Gehaltes an organischem Lösungsmittel. In 50 % wässriger Lösung erfolgt analog den Standards in gleicher Reaktionszeit eine umfangreichere Derivatisierung gegenüber einem Wasseranteil von 20 % (Abb. 3.81). So ist die Konzentration der Derivate von BADGE und BADGE·H₂O im Chromatogramm des Reaktionsansatzes mit 50 % Wasseranteil wesentlich größer. BADGE·H₂O ist zudem bei geringerer Polarität (20 % H₂O) nicht vollständig umgesetzt. Auch das Zwischenprodukt BADGE·1Cyst. zeugt von dem deutlichen Unterschied der beiden Derivatisierungen.

Im Bereich größerer Retentionszeiten ab etwa 65 min zeigt sich jedoch, dass bei einem höheren organischen Lösungsmittelanteil zudem wesentlich mehr Verbindungen eluieren. Daraus lässt sich

schließen, dass vor allem diese recht unpolaren Substanzen in Abhängigkeit der Polarität des Lösungsmittels bei der Derivatisierung präzipitieren und somit nicht mehr detektiert werden können.

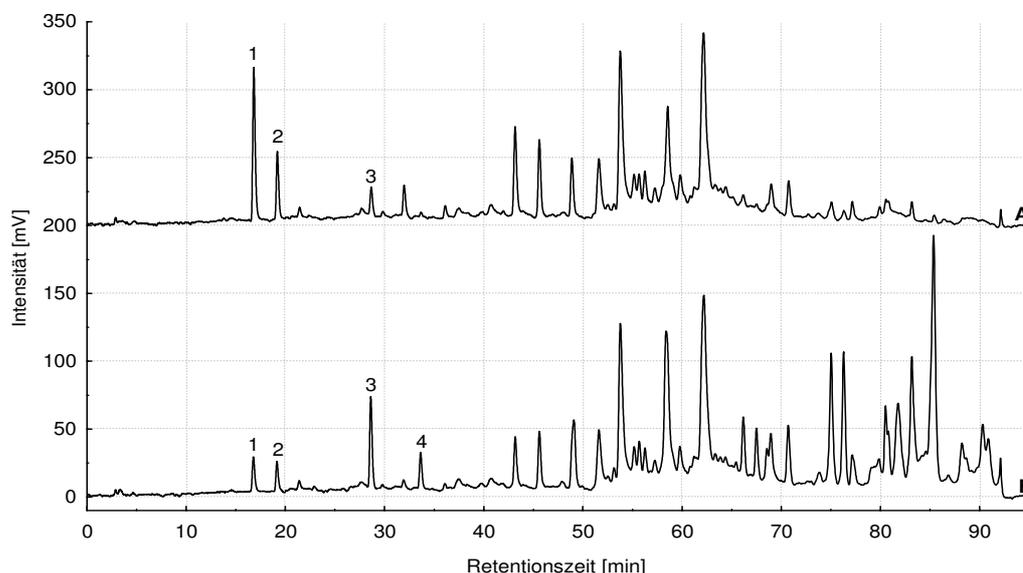


Abb. 3.81: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}- Chromatogramme der Derivatisierung des niedermolekularen Epoxidharzes 2 bei 20 (B) und 50 % (A) Wasseranteil im Reaktionsansatz, 1...BADGE·2Cyst., 2...BADGE·H₂O·Cyst., 3...BADGE·1Cyst., 4...BADGE·H₂O; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 75 min 95 % B, 85 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Der Austausch des Ethanols als bis dahin verwendetes organisches Lösungsmittel gegen Isopropanol bzw. Dioxan führte zu keiner verbesserten Derivatisierung. Acetonitril war ebenso ungeeignet, da es in diesem Fall die Voraussetzung als inertes Lösungsmittels zu fungieren, nicht erfüllte. Vielmehr konnte eine Additionsreaktion mit Cysteamin beobachtet werden. Da mit diesem Reaktionsprodukt immer noch eine Derivatisierung der Epoxidverbindungen möglich war, ist von einer Reaktion der Nitrilgruppe des Acetonitril und der Aminogruppe des Cysteamin zu einem Amidin auszugehen.²¹⁹

Die Löslichkeit des gesamten Harzes war somit nicht mit den für eine vollständige Derivatisierung nötigen Bedingungen kompatibel. Spät eluierende hochmolekulare Verbindungen präzipitieren bei dem entsprechenden Lösungsmittelverhältnis und werden somit bei der Derivatisierung nicht mit erfasst. Es war zudem nicht auszuschließen, dass dieses Verhalten auch die Derivatisierung anderer Verbindungen beeinflusst. Da in Hinblick auf die angestrebten Untersuchungen von Migraten vor allem die Substanzen < 1000 Da von Interesse waren, erfolgte die Auftrennung des Epoxidharzes 2 mittels SEC-UVD_{275nm} in die Fraktionen < und > 1000 Da (Abb. 3.82).

²¹⁹ Rappoport, Z., The chemistry of the cyano group, in Patai, S. eds., The chemistry of functional groups, Interscience Publishers a division of John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto 1970.

3 Ergebnisse und Diskussion

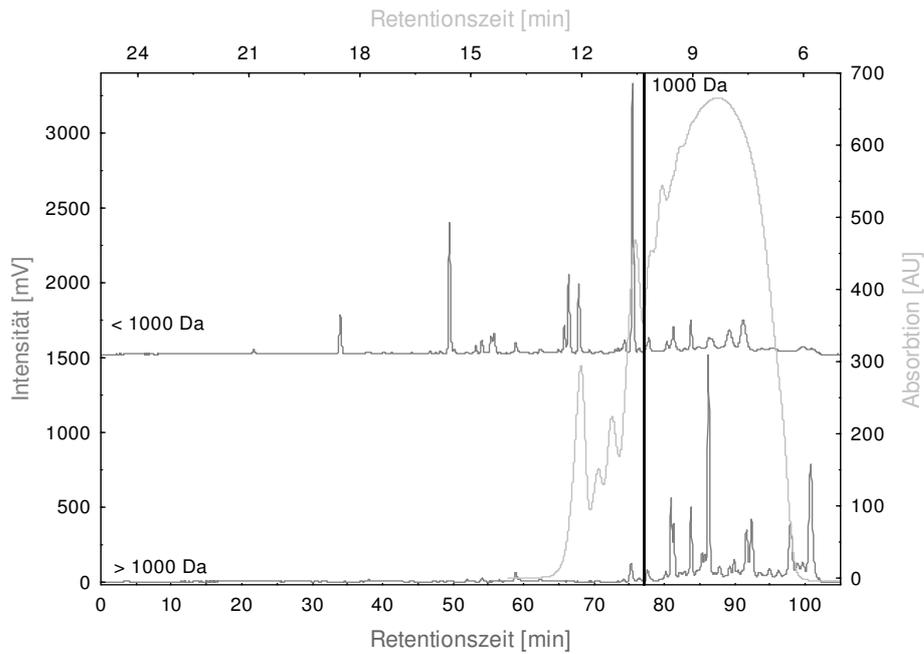


Abb. 3.82: Trennung des niedermolekularen Epoxidharzes 2 mittels SEC-UV_{D_{275nm}} in die Fraktionen $</> 1000$ Da sowie die RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme der Fraktionen; chromatographische Bedingungen: SEC: isokratisch THF, 5 ml/min bei 20 °C, SDV® 1000 Å, 5 μ , 20 x 300 mm; RP: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 75 min 95 % B, 95 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Im Anschluss wurde die Fraktion < 1000 Da erneut in 50 % der oben genannten Lösungsmittel derivatisiert.

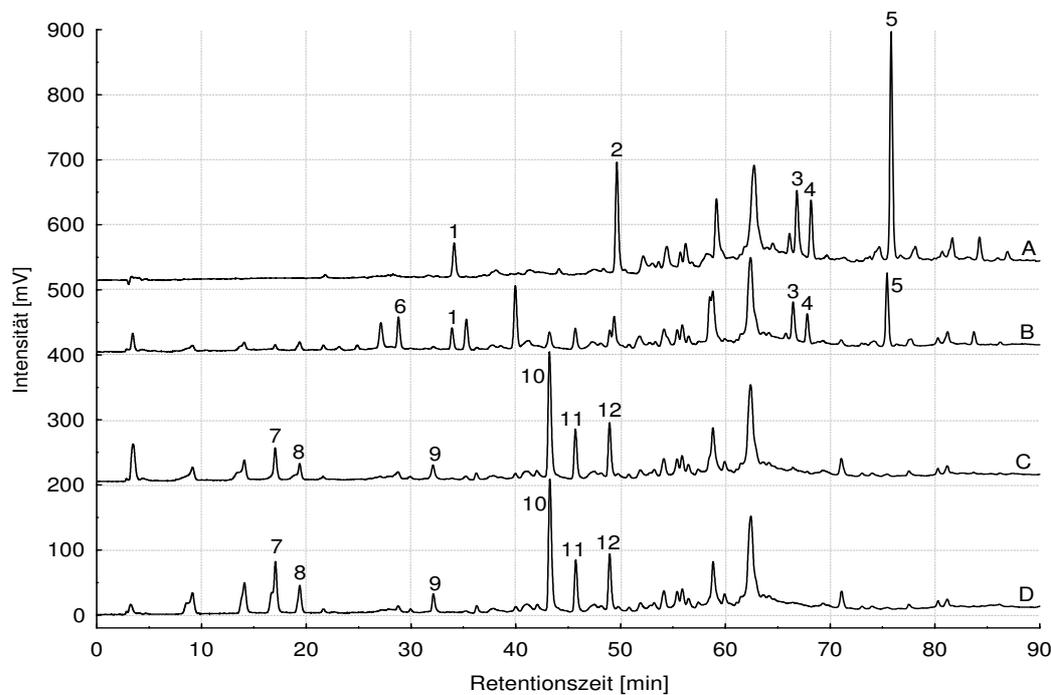


Abb. 3.83: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme der Derivatisierung des niedermolekularen Epoxidharzes 2 in 50 % Dioxan (B), 50 % Isopropanol (C) und 50 % Ethanol (D) im Vergleich zum underivatisierten Harz (A), 1...BADGE·H₂O, 2...BADGE, 3...BADGE(n=1), 4...BADGE(n=2)·H₂O, 5...BADGE(n=2), 6...BADGE·1Cyst., 7...BADGE·2Cyst., 8...BADGE·H₂O·Cyst., 9...BADGE(n=1)·2Cyst., 10...BADGE(n=2)·2Cyst., 11...BADGE-tBuPh·Cyst., 12...BADGE(n=2)·H₂O·Cyst.; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 95 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

In Abb. 3.83 ist deutlich zu sehen, dass nur bei Verwendung von 50 %igem Ethanol und Isopropanol eine vollständige Umsetzung der im Harz identifizierten Epoxidverbindungen erreicht werden konnte. Dagegen ist die Derivatisierung in 50 %igem Dioxan unter den gewählten Bedingungen deutlich weniger vorangeschritten. Bei Betrachtung der Polarität der drei Lösungsmittel (Elutionsstärke ϵ° gegenüber Silicagel: Dioxan 0,43; Isopropanol 0,6; Ethanol 0,68) wird ersichtlich, dass Dioxan weitaus unpolarer ist als Ethanol und Isopropanol.¹⁸⁹ Der Vorteil einer besseren Löslichkeit unpolarer Verbindungen in Dioxan im Vergleich zu Ethanol oder Isopropanol steht somit dem Nachteil gegenüber, dass dessen Polarität unter den gewählten Bedingungen für die Reaktion der Oxirangruppen mit Cysteamin nicht ausreichend ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde weiterhin Ethanol als organischer Lösungsmittelanteil für den Derivatisationsansatz verwendet.

Des Weiteren wurde nochmals versucht, die Cysteaminkonzentration in Hinblick auf die Kapazität des im Anschluss an die Derivatisierung zu verwendenden Ionenaustauschers zu verringern. Dazu wurde das Lösungsmittelvolumen des Inkubationsansatzes verringert, in dem die zu derivatisierende Probe zur Trockne gebracht wurde. Dabei wurde zunächst geprüft, ob es durch den Abdampfprozess zu keinen Abweichungen im Peakmasters der Chromatogramme und somit nicht zu Veränderungen der Probe kommt. Da dies nicht der Fall war, wurde die Derivatisierung mit einer Konzentration von 4 g/l durchgeführt. Sowohl bei den Standards als auch beim niedermolekularen Epoxidharz 2 konnte eine vollständige Derivatisierung beobachtet werden.

Abschließend ist für die Derivatisierung der epoxidischen Verbindungen zu sagen, dass zunächst eine Abtrennung der Substanzen < 1000 Da notwendig ist, um eine Präzipitatbildung höher molekularer Verbindungen bei einem Wasseranteil von 50 % in Ethanol zu verhindern. Des Weiteren wird die Umsetzung für 1 h bei 50 °C mit einer Cysteaminlösung von 4 g/l durchgeführt. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz mit H_3PO_4 angesäuert und mit 50 % Ethanol auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 5.3.6 zu entnehmen. Die Bildung von Oxiranen aus hydrochlorierten BADGE-Derivaten konnte im Laufe der Optimierung der Methode nicht vollständig verhindert werden, da bei der Quantifizierung jedoch nur vollständig umgesetzte Verbindungen Berücksichtigung finden, wird das Ergebnis dadurch nicht beeinflusst (Kap. 3.2.5).

3.2.2 Extraktion der Cysteaminderivate mittels Ionenaustauschermaterial

Im Anschluss an die erfolgreiche Derivatisierung waren die erhaltenen Cysteaminderivate der Epoxidverbindungen aus der Reaktionslösung zu entfernen. Dies sollte mittels der durch das Cysteamin eingeführten Aminogruppe mit Hilfe eines Kationenaustauschermaterials erfolgen. Das endgültige Ziel, die Derivate unmittelbar durch den Zusatz von Austauschermaterial aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, sollte über den Weg der klassischen Festphasenextraktion (SPE) erreicht werden. Um das optimale SPE-Material zu ermitteln, wurden 4 verschiedene stark saure Kationenaustauscher der Firmen *Varian*, *J.T. Baker*, *Macherey & Nagel* sowie *Dow Chemical* verwendet. Als Basismaterial wurde zum einen mit Propyl- bzw. Benzolsulfonsäure modifiziertes Kieselgel, zum anderen funktionalisiertes mit Divinylbenzol copolymerisiertes Polystyrolharz

gewählt. Der Kationenaustauscher der Firma *Dow Chemical* wies einen Vernetzungsgrad von 8 % auf (Abb. 3.84).

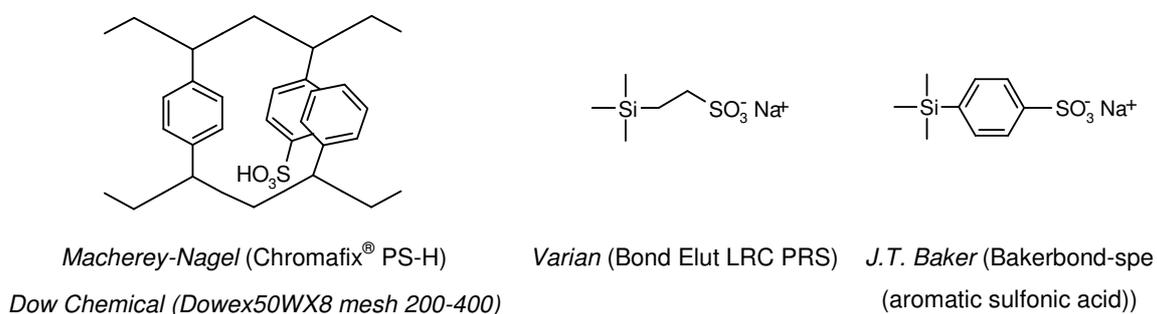


Abb. 3.84: verwendete funktionalisierte Basismaterialien der verschiedenen Firmen

Zunächst wurde die Optimierung der SPE wiederum mit Standardsubstanzen durchgeführt. Die SPE-Kartuschen wurden konditioniert und dabei mit H^+ -Ionen belegt. Da das Ziel in der Abtrennung der Cysteaminderivate lag, wurde das Hauptaugenmerk der Optimierung auf die vollständige Elution der nicht derivatisierten Verbindungen und den kompletten Rückhalt der Derivate gelegt. Eine anschließende Elution der Derivate vom Austauschermaterial wurde nicht angestrebt.

Die vollständige Bindung der Derivate an die Festphase war bei allen Materialien gegeben.

Bezüglich der Elution der nicht derivatisierten Verbindungen konnte jedoch festgestellt werden, dass bei der Verwendung von Acetonitril als Elutionsmittel die Wiederfindungsrate, wie bereits Petersen¹³¹ bei ähnlichen Arbeiten feststellen konnte, mit zunehmender Polarität der Standards sank (Abb. 3.85).

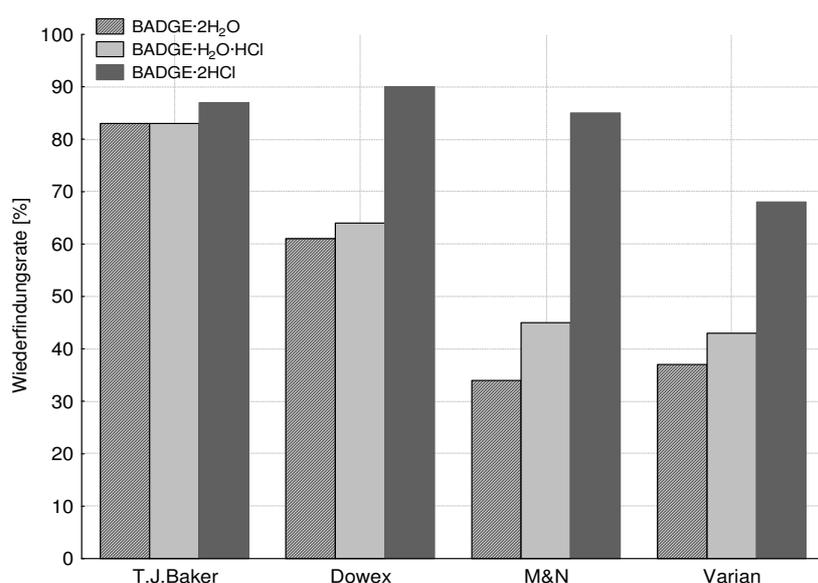


Abb. 3.85: Wiederfindungsraten von nicht derivatisierten Standards im 100 %igen MeCN – Eluat bei der Verwendung verschiedener Austauschermaterialien

Im Hinblick auf die Austauschermaterialien lässt sich außerdem anhand der Wiederfindungsraten erkennen, dass sich die Kartuschen von *Marcherey & Nagel* und *Varian* als am wenigsten geeignet erwiesen.

Analog zu Petersen¹³¹ wurde im Folgenden die Elution mit 90 %igem Acetonitril durchgeführt, wobei jedoch keine Verbesserung in der Wiederfindungsrate zu verzeichnen war. Demzufolge musste ein weiterer Faktor die Elution der Verbindungen beeinflussen. Neben dem anderen Festphasenmaterial, Petersen¹³¹ verwendete eine C18ec-SPE, bestand ein weiterer Unterschied im pH-Wert der aufgegebenen Probelösung. Während dieser bei Petersen¹³¹ im neutralen Bereich lag, wies die Probelösung nach der Derivatisierung mit Cysteamin durch die Ansäuerung mit H_3PO_4 einen pH-Wert von 3,1 auf. Im Folgenden wurde die Wiederfindungsrate der Standards bei neutralem und leicht basischem pH-Werten der Aufgabelösung im Vergleich zum bisherigen pH von 3,1 bestimmt (Abb. 3.86). Dazu wurde die Probelösung nach der Derivatisierung zum einen nicht angesäuert (pH 9), zum anderen der pH-Wert mit 0,2 M H_3PO_4 auf etwa 7 eingestellt. Die Austauschermaterialien von *Varian* und *Macherey & Nagel* wurden in diesem Fall aufgrund der vorherigen Ergebnisse nicht mehr verwendet. Dafür wurde neben dem 8 % vernetzten Divinylbenzol copolymerisierten Polystyrolharz auch ein nur 2 % vernetztes Harz (Dowex 50WX2, 200 - 400 mesh) eingesetzt. In jedem Fall steigt mit zunehmenden pH-Wert auch die Wiederfindungsrate. Wobei die Unterschiede bei der Verwendung des Kationenaustauschermaterials auf Kieselgelbasis von *J.T. Baker* am geringsten sind. Beim Vergleich der beiden harzbasierenden Materialien wurden die besten Ergebnisse mit dem 2 % vernetzten Harz erzielt. Somit wurde im Folgenden das Material von *J.T. Baker* sowie das 2 % vernetzte Harz von *Dow Chemical* verwendet. Auf die Ansäuerung der Reaktionslösung nach der Derivatisierung wurde im Weiteren verzichtet.

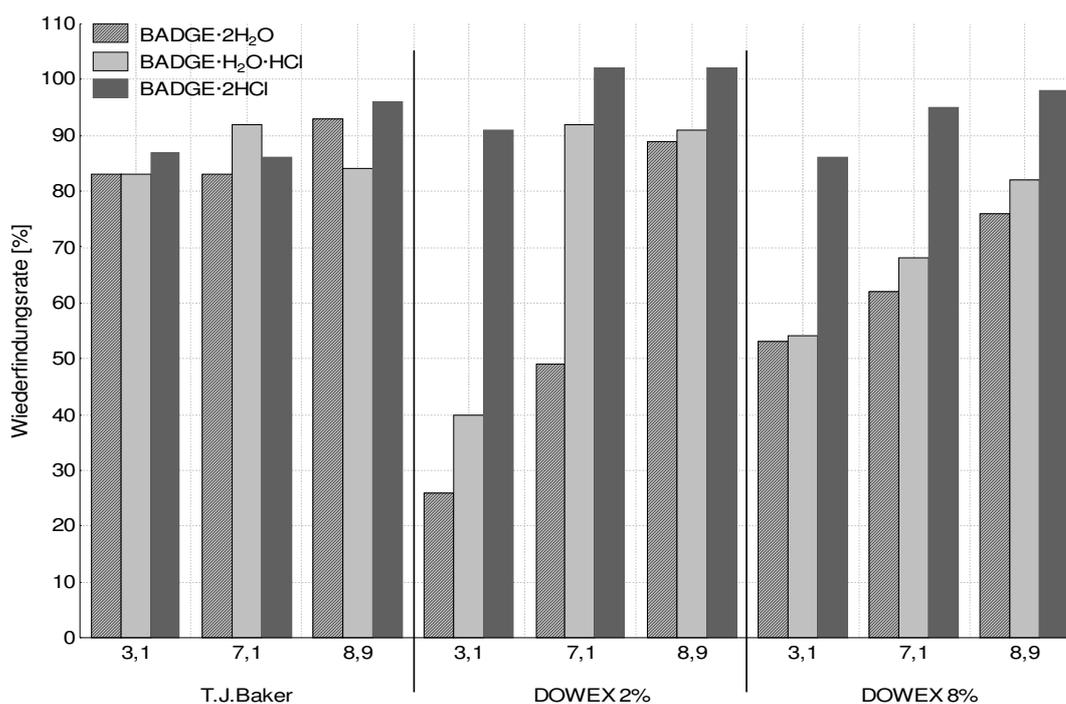


Abb. 3.86: Wiederfindungsraten bei unterschiedlichen pH-Werten der zur SPE eingesetzten Standardmischung

Nach der erfolgreichen Anwendung der SPE auf die Standardsubstanzen wurde anschließend die mit Cysteamin derivatisierte < 1000 Da Fraktion des Epoxid-Phenol-Coatingmigrates 1 eingesetzt (Abb. 3.87). Die Cysteaminderivate, die vor allem im vorderen Bereich des Chromatogrammes eluieren, sind vollständig eliminiert und auch sonst gibt es bezüglich des Peakmusters keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Austauschermaterialien.

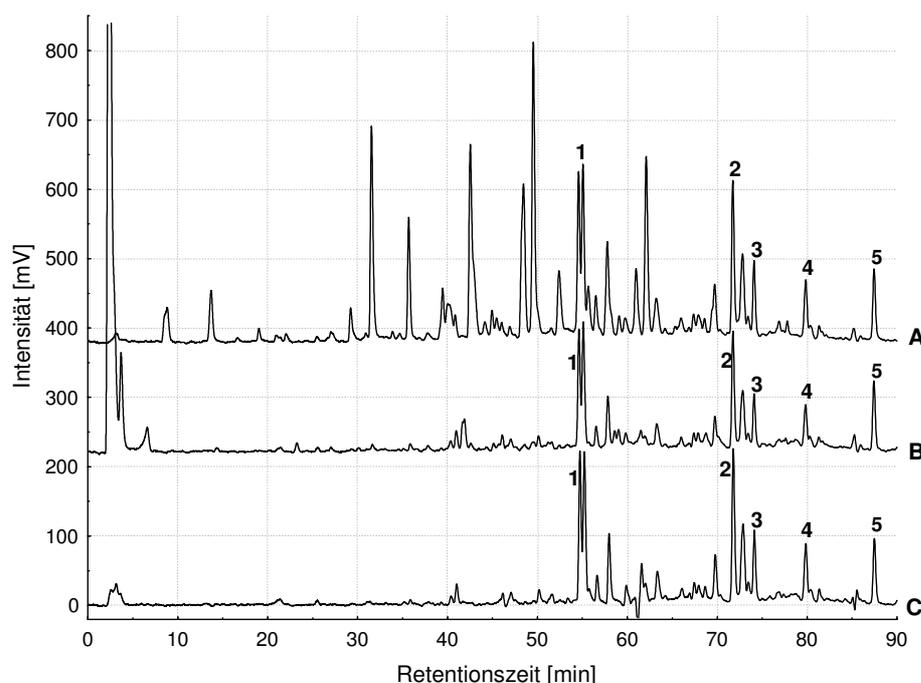


Abb. 3.87: Anwendung des Austauschermaterials von *J.T. Baker* (B) und *Dow Chemical 2 %* (C) auf das derivatisierte Epoxid-Phenol-Coatingmigrates 1 im Vergleich zum nicht extrahierten Migrat (A); markierte Verbindungen wurden zur Bestimmung der Wiederfindungsrate herangezogen; RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramme, chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 20 % B, 75 min 95 % B, 95 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Zur Bestimmung von Wiederfindungsraten wurden neben dem markanten Cyclo-di-BADGE vier weitere Peaks aus dem Chromatogramm ausgewählt und ihre Flächen vor und nach der SPE verglichen (Abb. 3.87, Tab. 3.13). Dabei zeigte sich, dass der Ionenaustauscher von *Dow Chemical 2 %* dem Material von *J.T. Baker* überlegen ist.

Tab. 3.13: Wiederfindungsraten der markierten Peaks im Chromatogramm Abb. 3.87

	Wiederfindungsrate [%]	
	<i>J.T. Baker</i>	<i>Dow Chemical 2 %</i>
1 Cyclo-di-BADGE	80	101
2 Peak RT = 72 min	77	100
3 Peak RT = 74 min	72	99
4 Peak RT = 80 min	72	100
5 Peak RT = 86 min	96	93

Für die Verwendung des Kationenaustauschers als Extraktionsmaterial direkt nach der Derivatisierung in der Reaktionslösung, wurde dieses entsprechend konditioniert. Im letzten Schritt wurde mit Wasser gespült, wodurch das Material aufquoll. Die Quellung des Polymerharzes ermöglicht im Allgemeinen eine bessere räumliche Zugänglichkeit zu den funktionellen Gruppen, die den Austausch bewirken.¹⁸⁰ Im Folgenden wurden 100 mg des so vorbereiteten Kationenaustauschers zu dem derivatisierten Epoxy-Phenol-Coatingmigrat 1 gegeben. Dabei ergaben sich entgegen den Ergebnissen der klassischen SPE, wie anhand der Tab. 3.14 deutlich zu sehen ist, wesentlich geringere Wiederfindungsraten. Diese Unterschiede konnten auf den Anteil an organischem Lösungsmittel im Reaktionsansatz zurückgeführt werden. Bei der SPE wurde die Probe in 50 % Ethanol aufgegeben. Zur Elution der nicht derivatisierten Verbindungen wurde 90 % Acetonitril verwendet. Durch die direkte Zugabe des Austauschermaterials zur Probe erfolgte demzufolge die Extraktion nun bei 50 % Ethanol. Wurde die Probe nach der Derivatisierung nicht mit 50 % Ethanol sondern mit 50 % Acetonitril aufgefüllt, so konnte bei der anschließenden Extraktion eine leichte, aber keine zufriedenstellende Steigerung der Wiederfindungsrate verzeichnet werden (Tab. 3.14). Erst mit der Erhöhung des Acetonitrilgehaltes in der Probe auf knapp 80 %, wurden die Ergebnisse der SPE erreicht (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Wiederfindungsraten der direkten Extraktion bei unterschiedlichem Anteil an organischem Lösungsmittel in der Probe (markierte Peaks im Chromatogramm Abb. 3.87), SPE-Material *Dow Chemical 2%*

	Wiederfindungsrate [%]		
	50 % Ethanol	50 % Acetonitril	~ 80 % Acetonitril
1 Cyclo-di-BADGE	42	64	100
2 Peak RT = 72 min	5	7	98
3 Peak RT = 74 min	22	61	101
4 Peak RT = 80 min	n.d.	n.d.	95
5 Peak RT = 86 min	n.d.	28	97

n.d. ... nicht detektierbar

Die optimierten Bedingungen für die vollständige Extraktion der Cysteaminderivate ohne Verlust an nicht derivatisierten Verbindungen können wie folgt zusammengefasst werden: Als Kationenaustauschermaterial wird ein funktionalisiertes mit Divinylbenzol copolymerisiertes Polystyrolharz der Firma *Dow Chemical*, welches einen Vernetzungsgrad von 2 % und eine Korngröße von 200 - 400 mesh aufweist, verwendet. Die Probe wird nach der Derivatisierung mit Acetonitril auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und nicht angesäuert, so dass die Extraktion im leicht basischen Milieu erfolgt. Der Kationenaustauscher wird der Probe anschließend direkt zugesetzt. Der Ansatz wird etwa 1 min kräftig geschüttelt, filtriert und dann der HPLC direkt zugeführt.

3.2.3 Kontrolle der Derivatisierung und Extraktion mittels Interne Standards

Standards

Für die ständige Kontrolle der Derivatisierung sowie der Extraktion der Derivate war der Einsatz von internen Standards erforderlich. Als solche sollten BPM und sein korrespondierender Diglycidylether (BMDGE) eingesetzt werden. Da BMDGE nicht kommerziell erhältlich ist, wurde dieser in Anlehnung an Petersen¹³¹ aus seinem Phenol synthetisiert (Abb. 3.88).

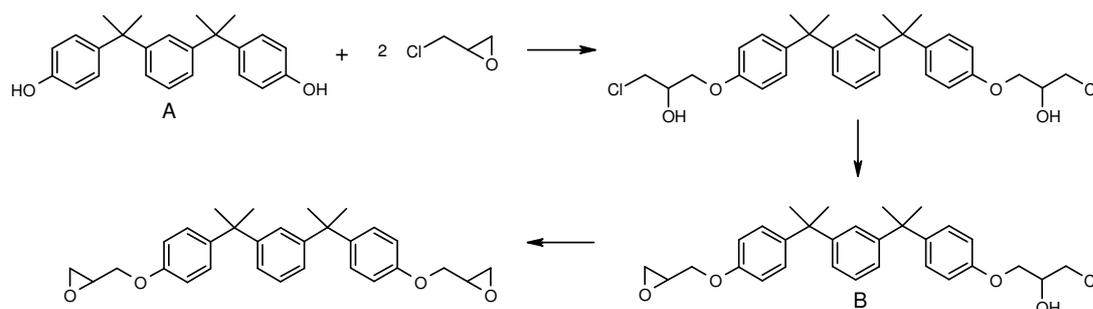


Abb. 3.88: Syntheschema von 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether (BMDGE) (B) aus 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bis-phenol (BPM) (A)

Die Synthese erfolgte im Gegensatz zu Petersen¹³¹ im Halbmikromaßstab. Da nur wenige Milligramm benötigt wurden, war eine Optimierung in Hinblick auf eine entsprechend hohe Ausbeute nicht relevant. Zudem wurde die Reindarstellung des Endproduktes aufgrund der geringeren Menge an Produkt nicht, wie von Petersen beschrieben, säulenchromatographisch an Kieselgel vorgenommen, sondern mittels präparativer NP-HPLC erreicht. Der Diglycidylether ist ein farbloser Sirup und konnte mit einer Reinheit von 99 % (HPLC-UVD) erhalten werden.

Die Methode zur Darstellung von BMDGE ist unter Kapitel 5.3.7 zusammengefasst.

Bei der Chromatographie von mehreren Standards einschließlich der vorgesehenen internen Standards zeigte sich, dass BPM bei 38,8 min unmittelbar nach, aber noch basisliniengetreunt von BADGE, eluiert. Der synthetisierte Diglycidylether coeluiert dagegen bei 53,8 min mit dem BADGE – Dimer (Abb. 3.89).

Dies stellt jedoch kein Problem dar, da auch diese Verbindung bei der Derivatisierung mit Cysteamin umgesetzt wird. Vielmehr ist diese Koelution mit einer epoxidierten Substanz bei der Vielzahl zu erwartender Peaks in einem Coatingmigrat als positiv zu werten. Als derivatisierte Verbindung eluiert BMDGE bei einer Retentionszeit von 18,9 min. Nach einer erfolgreichen Extraktion der Derivate sollte folgerichtig zu dieser Zeit kein Peak mehr detektiert werden.

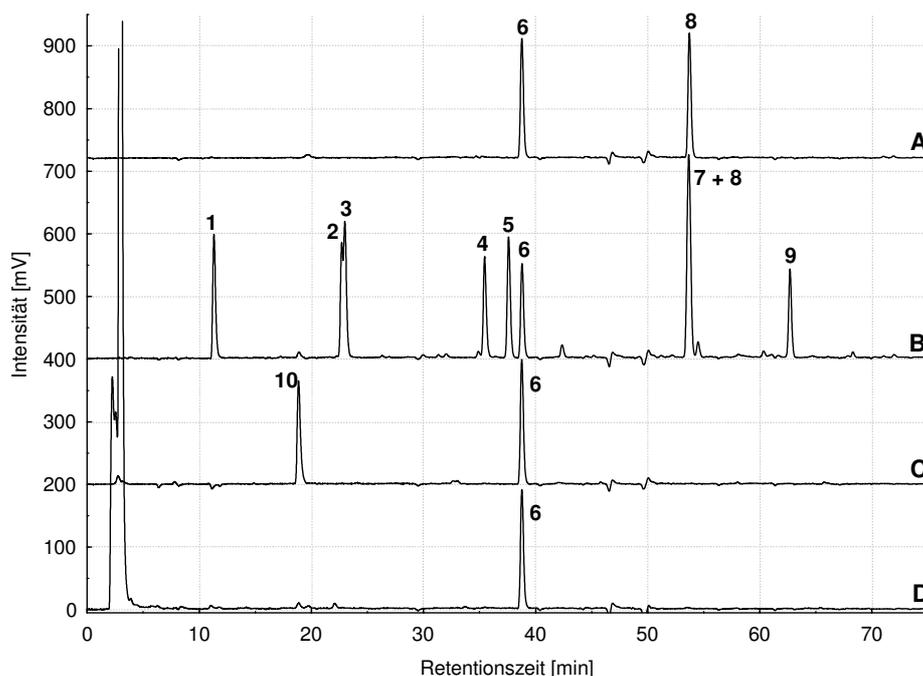


Abb. 3.89: RP-HPLC/FLD_{275/305 nm}-Chromatogramme zur Eignung der gewählten Internen Standards BPM und BMDGE, A...Interne Standards, B...Standardmix einschließlich der Internen Standards, C...Interne Standards mit Cysteamin derivatisiert, D...Derivate der Internen Standards nach der SPE, 1...BADGE·2H₂O, 2...BADGE·H₂O·HCl, 3...BADGE·H₂O, 4...BADGE·2HCl, 5...BADGE, 6...BPM, 7...BADGE(n=1), 8...BMDGE, 9...BADGE(n=2), 10...BMDGE·2Cyst.; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6 (Fraktion < 1000 Da)

3.2.4 Quantifizierung der migrierenden epoxidhaltigen Verbindungen

Abschließend war die Konzentration der migrierenden Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen von Interesse. Dabei stellte sich das gleiche Problem wie bei der Quantifizierung der phenolischen Verbindungen. Die direkte Bestimmung über die individuellen Kalibriergeraden der einzelnen identifizierten Substanzen war allein durch die nicht gegebene Verfügbarkeit der Verbindungen nicht möglich. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzaktivität der BADGE-Derivate ist aber auch eine Quantifizierung über die Kalibriergerade von BADGE als BADGE-Äquivalente nicht hinreichend genau möglich. Dabei ist die Differenz der Response bei der Fluoreszenzmessung zwischen BADGE-Monomer, Dimer und Trimer zwar geringer als 10 %, der Unterschied wird jedoch mit zunehmender Varianz des prozentualen Anteils der BPA-Gruppe am Gesamtmolekül größer.¹²⁶ Schaefer et al.¹²⁶ konnten zeigen, dass die Fluoreszenzaktivität sowohl von der Anzahl der BPA-Grundkörper im Molekül als auch vom Molekulargewicht abhängig ist. Sie entwickelten daher eine indirekte Bestimmungsmethode über die Chromophorkonzentration. Die Chromophorkonzentration (c_c) ergibt sich dabei aus dem Quotienten des Produktes der Substanzkonzentration (c_s) mit der Anzahl der BPA-Gruppen im Molekül (n) und dem Molekulargewicht (M) (Gl. 3.3).^{126, 182}

In Abb. 3.90 sind die Flächeneinheiten entsprechender Konzentrationen an BMDGE und BADGE über die Chromophorenkonzentration aufgetragen. Wobei für die Chromophorenkonzentration von BMDGE ein Wert von 1,5 verwendet wurde. Durch die Berücksichtigung der unterschiedlichen

Fluoreszenzaktivität beider Verbindungen werden die Differenzen zwischen den Substanzen eliminiert und die einzelnen Kalibriergeraden fallen zusammen.

$$C_c = C_s \cdot \frac{n}{M} \quad (\text{Gl.3.3})$$

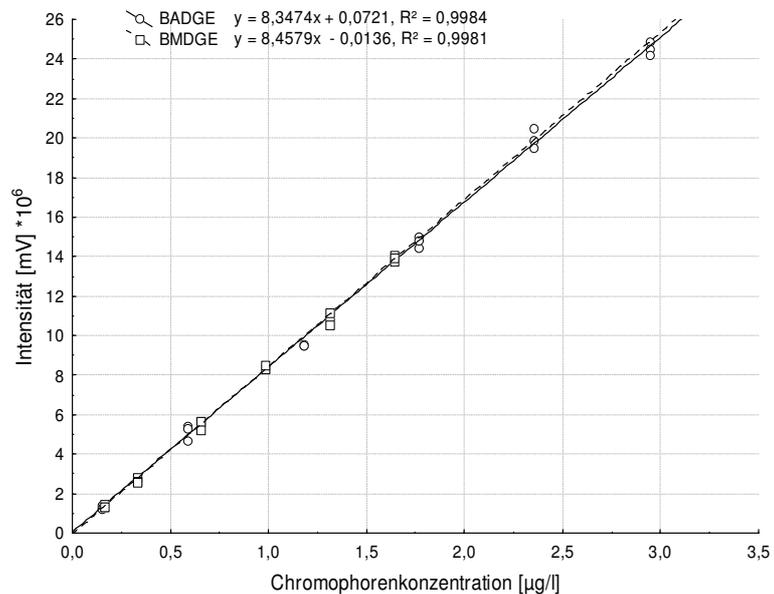


Abb. 3.90: Kalibrierung von BADGE und BMDGE über die Chromophorenkonzentration

Es ist somit möglich, über die Peakfläche die Chromophorkonzentration der einzelnen Verbindungen zu berechnen. Aus dieser kann anschließend mittels der über RP-HPLC/ESI-MSD bestimmten molekularen Masse und der Anzahl an BPA-Grundkörpern die Konzentration der eigentlichen Substanz ermittelt werden.

Die ausführliche Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Epoxidverbindungen < 1000 Da aus Coatingmigraten durch Derivatisierung mit Cysteamin ist unter Kapitel 5.3.6 zusammengefasst.

3.2.5 Anwendung der optimierten Methode zur Isolierung epoxidhaltiger Verbindungen auf kommerzielle Coatingmigratte

Im Folgenden sollte die vollständig optimierte Methode zur Isolierung epoxidhaltiger Verbindungen auf kommerzielle Coatings angewendet werden. Dazu wurden 95 %ige EtOH-Migratte dreier Epoxid-Phenol-Coatings, eines Organosol-Coatings und eines Epoxid-Anhydrid-Coatings entsprechend den beschriebenen Bedingungen der DIN EN 1186 sowie der Richtlinien 97/48/EG und 2007/19/EG hergestellt.^{86, 87, 220}

Anschließend wurden die Migratte nach der Methode 5.3.6 aufgearbeitet und mittels RP-HPLC/FLD analysiert. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte über RP-HPLC/ESI-MSD in den

²²⁰ DIN EN 1186, Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln. Kunststoffe: Teil 1: Leitfaden für die Auswahl der Prüfbedingungen und Prüfverfahren für die Gesamtmigration. Teil 14: Prüfverfahren für „Ersatzprüfungen“ für die Gesamtmigration aus Kunststoffen, die für den Kontakt mit fettigen Lebensmitteln bestimmt sind, unter Verwendung der Prüfmedien Iso-Octan und 95 %igen Ethanol, DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 2002, Beuth Verlag, Berlin.

Gesamtmigraten. In Tab. 3.15 sind alle in den Harzen identifizierten Substanzen aufgelistet, die Verbindungen mit intakten Epoxidverbindungen wurden hervorgehoben.

Tab. 3.15: Identifizierte Verbindungen in den Migraten verschiedener kommerzieller Epoxid-Coatings,

	Substanz	M	M+H ⁺	NH ⁺ -Addukt	Na ⁺ -Addukt	K ⁺ -Addukt
1	BADGE	340	341	358	363	379
2	BADGE·2H ₂ O	376	377	394	399	415
3	BADGE·BuEtOH	458	459	476	481	497
4	BADGE·tBuPh	490	491	508	513	529
5	BADGE·H ₂ O·BuEtOH	476	477	494	499	515
6	BADGE·2BuEtOH	576	577	594	599	615
7	Cyclo-di-BADGE	568	569	586	591	607
8	BADGE(n=1)	624	625	642	647	663
9	BADGE(n=1)·H₂O	642	643	660	665	681
10	BADGE(n=1)·2H ₂ O	660	661	678	683	699
11	BADGE(n=1)·HCl	660	661	678	683	699
12	BADGE(n=1)·H ₂ O·HCl	678	679	696	701	717
13	BADGE(n=1)·PrOH	684	685	702	707	723
14	BADGE·BPA·BuEtOH	686	687	704	709	725
15	BADGE(n=1)·2HCl	696	697	714	719	735
16	BADGE(n=1)·BuOH	698	699	716	721	739
17	BADGE(n=1)·EtEtOH	714	715	732	737	753
18	BADGE(n=1)·H ₂ O·BuOH	716	717	734	739	755
19	BADGE(n=1)·H ₂ O·EtEtOH	732	733	750	755	771
20	BADGE(n=1)·BuEtOH	742	743	760	765	781
21	BADGE(n=1)·H ₂ O·BuEtOH	760	761	778	783	799
22	BADGE(n=1)·BuEtOH·BuOH	816	817	834	839	855
23	BADGE(n=1)·BPA	852	853	870	875	891
24	BADGE(n=1)·2BuEtOH	860	861	878	883	899
25	BADGE(n=2)	908	909	926	931	952
26	BADGE(n=2)·H₂O	926	927	944	949	965
27	BADGE(n=2)·HCl	942	943	962	967	973
28	BADGE(n=2)·2HCl	980	981	998	1003	1019
29	BADGE(n=2)·BuOH	982	983	1000	1005	1021
30	BADGE(n=2)·BuEtOH	1026	1027	1044	1049	1065

Im Folgenden sind die Chromatogramme der verschiedenen Coating-Migrate dargestellt (Abb. 3.91 bis Abb. 3.95). Dabei ist jeweils das Gesamtmigrat (A), die Fraktion < 1000 Da (B) und der Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion (C) gegenüber gestellt. Daneben ist der Grenzbereich der Verbindung mit einer molaren Masse von 1000 Da gekennzeichnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

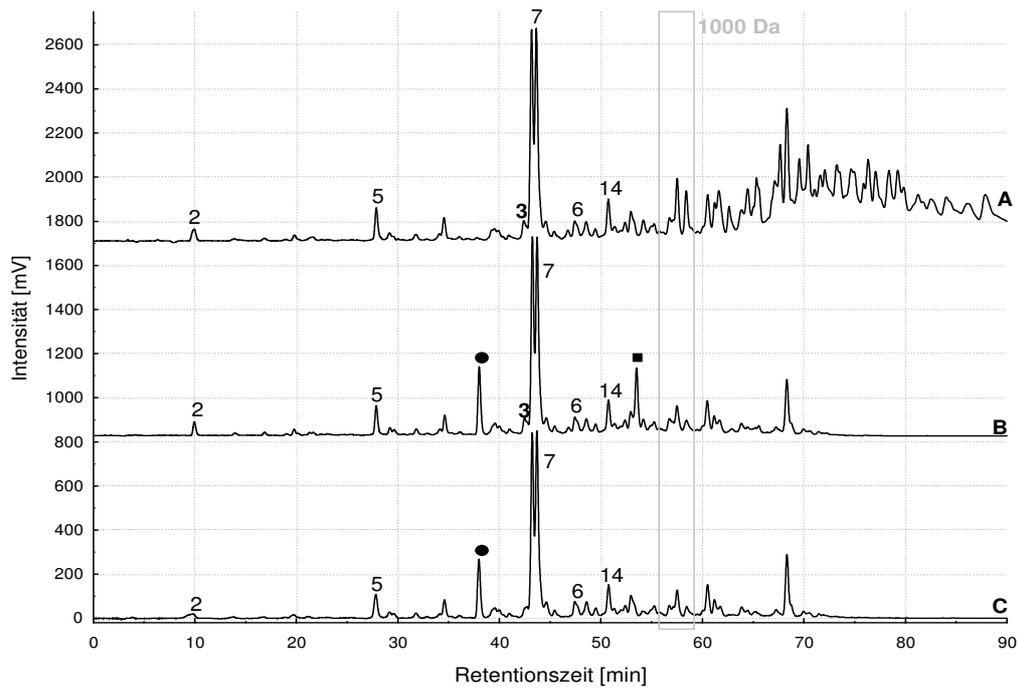


Abb. 3.91: RP-HPLC/FLD_{275/305nm} - Chromatogramme des Epoxy-Anhydrid-Coatingmigrates (95% EtOH), (A) Gesamtmigrat, (B) Fraktion < 1000 Da, (C) Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion; markierte Verbindungen s. Tab. 3.15; ● BPM, ■ BMDGE; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6

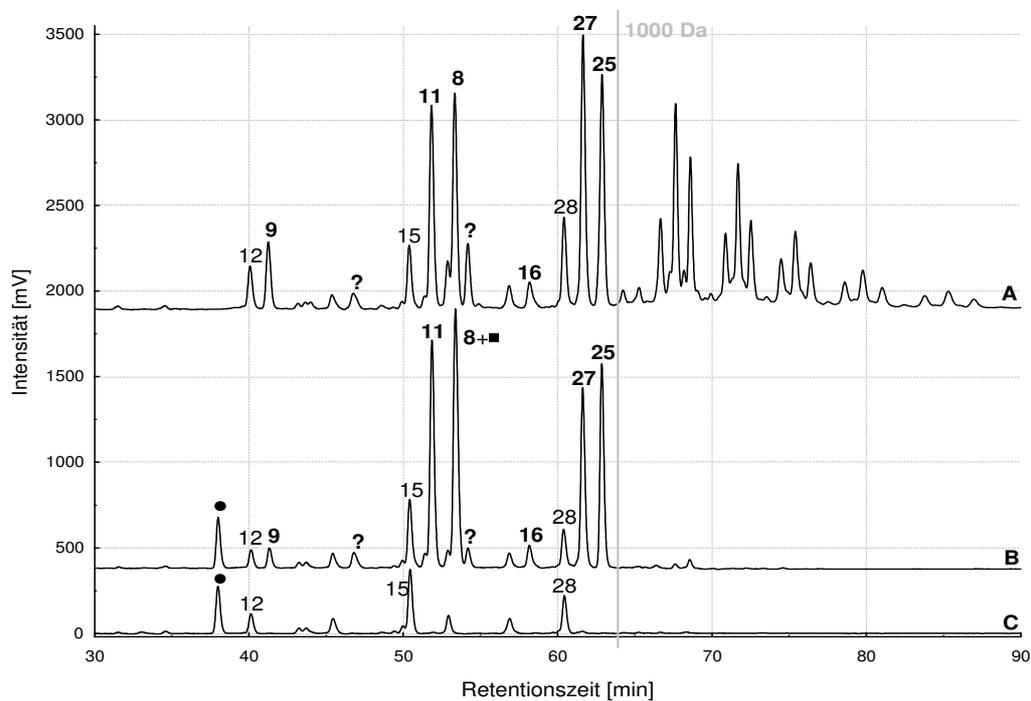


Abb. 3.92: RP-HPLC/FLD_{275/305nm} - Chromatogramme des Organosol-Coatingmigrates (95% EtOH), (A) Gesamtmigrat, (B) Fraktion < 1000 Da, (C) Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion; markierte Verbindungen s. Tab. 3.15; ● BPM, ■ BMDGE; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6

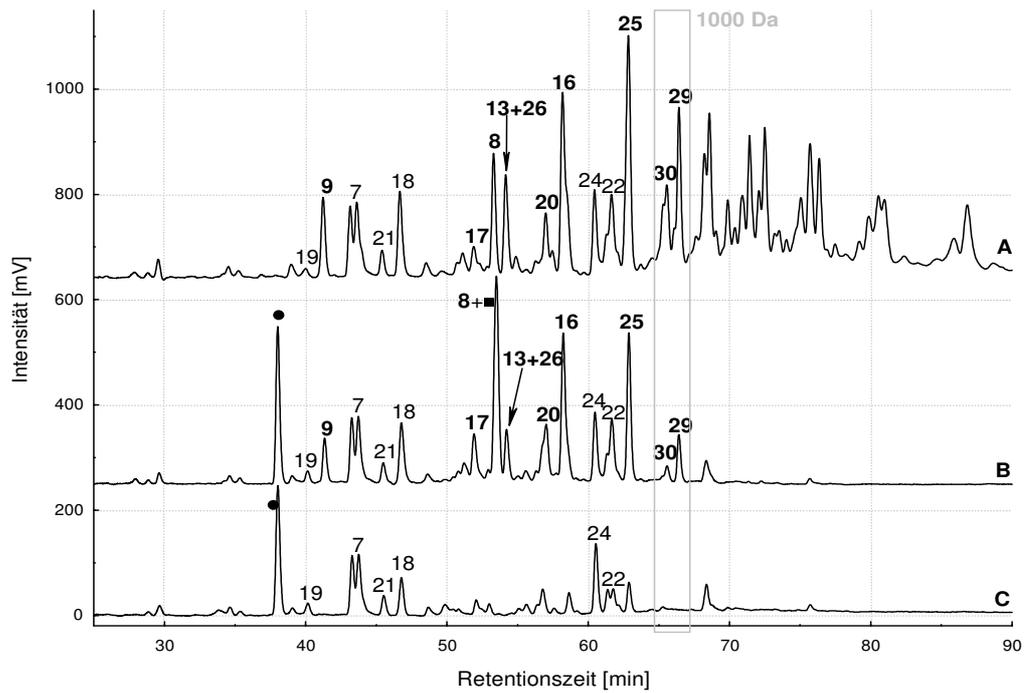


Abb. 3.93: RP-HPLC/FLD_{275/305nm} - Chromatogramme des Migrates des Epoxy-Phenol-Coatings 1 (95% EtOH), (A) Gesamtmigrat, (B) Fraktion < 1000 Da, (C) Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion; markierte Verbindungen s. Tab. 3.15; ● BPM, ■ BMDGE; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6

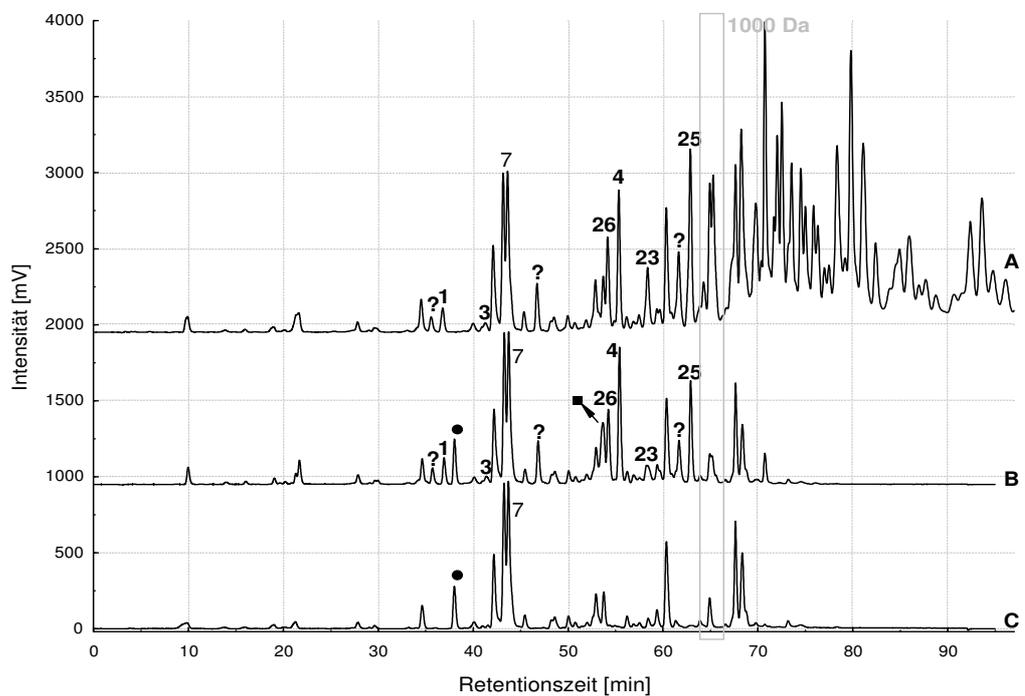


Abb. 3.94: RP-HPLC/FLD_{275/305nm} - Chromatogramme des Migrates des Epoxy-Phenol-Coatings 3 (95% EtOH), (A) Gesamtmigrat, (B) Fraktion < 1000 Da, (C) Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion; markierte Verbindungen s. Tab. 3.15; ● BPM, ■ BMDGE; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6

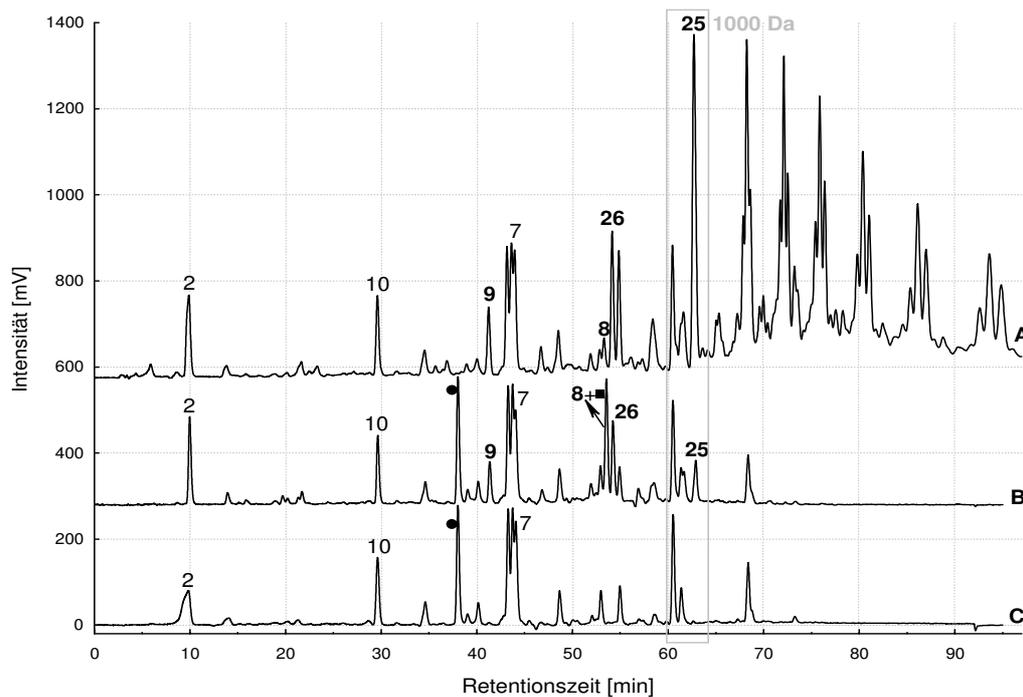


Abb. 3.95: RP-HPLC/FLD_{275/305nm} - Chromatogramme des Migrates des Epoxy-Phenol-Coatings 4 (95% EtOH), (A) Gesamtmigrat, (B) Fraktion < 1000 Da, (C) Reaktionsansatz nach Derivatisierung und Extraktion; markierte Verbindungen s. Tab. 3.15; ● BPM, ■ BMDGE; chromatographische Bedingungen: s. 5.3.6

Insgesamt konnten für die einzelnen Coatingmigrante recht unterschiedliche Gehalte an Substanzen mit intakten Epoxidgruppen ermittelt werden. Auch die Anzahl der in den einzelnen Harzen enthaltenen oxirangruppenhaltigen Verbindungen ist sehr unterschiedlich, was möglicherweise an unterschiedlichen Einbrennzeiten, -temperaturen aber auch der Menge an Lack pro m² und an der Art und Menge des Reaktionspartners liegen kann.

Bei der Quantifizierung wurden nur vollständig umgesetzte Verbindungen berücksichtigt, so dass der teilweise Abbau von hydrochlorierten BADGE-Derivaten keinen Einfluss auf das Ergebnis hat.

Für die Verbindungen, die nicht identifiziert werden konnten, die jedoch aufgrund ihres Verhaltens bei der Derivatisierung mit Cysteamin eindeutig als Substanzen mit reaktionsfähigen Oxirangruppen bestimmt werden konnten, wurde die Konzentration an Epoxidgruppen abgeschätzt. Dabei wurden die Verbindungen mit einer Retentionszeit < 40 min als BADGE, zwischen 40 und 60 min als BADGE(n=1) und über 60 min als BADGE(n=2) berechnet.

Im Migrant des Organosol-Coatings wurde der höchste Gehalt an Substanzen mit intakten Epoxidgruppen bestimmt, wobei es sich hauptsächlich um nicht umgesetztes BADGE Dimer und Trimer sowie deren einfach hydrochlorierte Derivate handelt. Dies erklärt sich aus der Zusammensetzung des Lackes, in welchem die Epoxidkomponente zur Elimination von freier HCl zur Stabilisierung des PVC eingesetzt wird.

In den Migraten der Epoxid-Phenol-Coatings ist das Spektrum der Verbindungen größer, wobei in allen Fällen auf BADGE(n=2) der größte Anteil entfällt.

Die Konzentration der epoxidischen Verbindungen in den Coatingmigraten liegt zwischen 18,5 und 835 µg/dm². Der über die Flächen im Chromatogramm berechnete Anteil dieser reaktionsfähigen

Substanzen an der Fraktion unter 1000 Da entspricht dabei 2,6 bzw. 76,3 %. Die Chromophorkonzentrationen sowie die daraus ermittelte Substanzkonzentrationen der einzelnen identifizierten Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen in den Migraten sind unter Kapitel 5.4.3 tabellarisch zusammengestellt.

Tab. 3.16: Anteil an Epoxidverbindungen in den Migraten der einzelnen Coatings

Coating	epoxidische Verbindungen [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]	Epoxidgruppen [$\mu\text{mol}/\text{dm}^2$]	Flächenanteil im Chromatogramm < 1000 Da [%]
Epoxid-Anhydrid	18,5	0,04	2,6
Organosol	835,7	1,62	76,3
Epoxid-Phenol 1	250,7	0,43	54,6
Epoxid-Phenol 3	595,2	1,29	40,9
Epoxid-Phenol 4	184,0	0,36	32,6

Die in der Literatur beschriebenen Arbeiten befassten sich bezüglich der Quantifizierung bisher nur mit Einzelsubstanzen oder mit der Gesamtheit der migrierenden Verbindungen, wobei meist die Fokussierung auf Substanzen unter 1000 Da liegt. Eine Unterscheidung zwischen BADGE-Derivaten mit und ohne intakte Epoxidgruppen erfolgte bislang nicht. So bestimmten Biedermann und Grob¹²⁵ in den Extrakten zweier Konservendosen einen Gehalt an migrierenden Substanzen von 2,8 bzw. 2,6 mg/dm^2 , wobei sie davon nur 20 % (0,57 mg/dm^2) bzw. 13 % (0,35 mg/dm^2) identifizieren konnten. Der Anteil der Derivate mit reaktionsfähigen Epoxidgruppen beträgt dabei 146 bzw. 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bereits über 50 % der migrierenden Verbindungen < 1000 Da zweier Epoxyanhydrid-Coatings konnten Schaefer et al.¹²⁶ bestimmen. Die Konzentration der identifizierten Substanzen mit intakten Oxirangruppen sowie über die Verordnung 1895/2005/EG rechtlich geregelten BADGE-Derivate betrug dabei 150 bzw. 250 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$.⁹⁴

Bei beiden Arbeitsgruppen ist anzunehmen, dass der tatsächliche Gehalt an Substanzen mit reaktionsfähigen Epoxidgruppen größer ist, da in beiden Fällen nur ein Teil des Migrates identifiziert werden konnte. Der Vorteil der vorliegenden Methode besteht in der Möglichkeit, unabhängig von einer Identifizierung, alle Substanzen mit intakten Oxirangruppen bestimmen zu können. Die Quantifizierung kann daneben, wie bei Schaefer et al.¹²⁶ sowohl bei molmassenbekannten als auch bei nicht identifizierten Verbindungen vereinfacht über die Chromophorenkonzentration konkret bzw. als Abschätzung über entsprechende Derivate erfolgen.

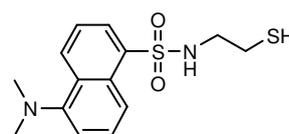
3.3 Epoxide mit dermalen Kontakt

Mit dem stetig steigenden Einsatz von Epoxidverbindungen in Materialien des Baugewerbes häufte sich das Auftreten von allergischen Reaktionen auf diese Substanzen. Die Diagnose erfolgt in der Regel mit Standardtestsubstanzen in einen Epikutantest. Im Folgenden sollte die Zusammensetzung der verwendeten Testsubstanzen untersucht werden, da darüber kaum Informationen vorhanden sind. Um ein möglichst breites Spektrum der in der Industrie eingesetzten Harze und Reaktivverdünner mit den Untersuchungen abzudecken und somit Unterschiede in der Herstellung und Zusammensetzung zu erfassen, wurden von verschiedenen Firmen Harze und Reaktivverdünner bezogen. Des Weiteren stellte der Kooperationspartner *Hermal Chemie* Untersuchungsmaterial zur Verfügung, darunter u. a. Verbindungen, welche in der EPOX 2000 - Studie von Geier et al.⁸¹ in Patchtests verwendet wurden.

Die Analyse der Harze und Reaktivverdünner umfasste dabei u. a. die RP-HPLC/UVD_{275nm} bzw. -ELSD-Chromatographie und die Identifizierung der enthaltenen Verbindungen über RP-HPLC/ESI-MSD. Informationen über den Gehalt an intakten Epoxidgruppen wurde über die Bestimmung des Epoxidäquivalents durch Titration nach DIN EN ISO 3001 erhalten.¹¹⁶ Über die Peakflächen im Chromatogramm wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Verbindungen abgeschätzt. Zusätzlich sollten aliphatische Verbindungen aufgrund ihrer UV-Inaktivität und der nicht vorhandenen Linearität des ELSD's mit 5-Dimethylamino-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin, DansylCyst.) derivatisiert werden. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mittels RP-HPLC/UVD_{250nm} bzw. CLND. Zunächst musste jedoch Dansylcysteamin synthetisiert werden, da es kommerziell nicht erhältlich war.

3.3.1 Synthese von 5-Dimethylamino-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin)

Die Synthese von Dansylcysteamin (Abb. 3.96) erfolgte in Anlehnung an verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren.



Sowohl Seiler und Wiechmann²²¹ als auch Schulze und Neuhoff²²² verwendeten für die Derivatisierung eine wässrige Acetonlösung.

Abb. 3.96: Dansylcysteamin

Die Arbeitsgruppe um Seiler und Wiechmann²²¹ setzten dabei Na₂CO₃, Schulze und Neuhoff²²² dagegen NaHCO₃ ein, um ein leicht basisches Milieu zuschaffen. In beiden Arbeiten erfolgte die Reaktion mit einem Überschuss an Dansylchlorid.

Als Anfangsbedingungen für die Optimierung der Darstellung von Dansylcysteamin wurden analog zu Schulze und Neuhoff²²² ein schwach basisches Milieu (Aceton : 0,05 M NaHCO₃, 70 : 30 (v/v)) eine Reaktionszeit von 30 min, eine Reaktionstemperatur von 37 °C sowie ein molares Verhältnis

²²¹ Seiler, N.; Wiechmann, M., Quantitative Bestimmung von Aminen und von Aminosäuren als 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäureamide auf Dünnschichtchromatogrammen, Z Anal Chem 1966, Vol. 220, Nr. 2, 109 - 127.

²²² Schulze, E.; Neuhoff, V., Oxidative Nebenreaktionen bei der Dansylierung von SH-Verbindungen, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1976, Vol. 357, 225 - 231.

von Cysteamin zu Dansylchlorid von 1 : 25 gewählt. Aufgrund der Eigenschaft des Dansylchlorids als mildes Oxidationsmittel zu wirken und somit die Bildung von Disulfiden zu fördern, wurde von Schulze und Neuhoff²²² der Reaktionsansatz im Anschluss an die Inkubation mit Dithioerythrit versetzt. Das eigentliche Produkt wird somit erst nach Reduktion des Disulfids erhalten. In der Versuchsvorschrift von Seiler und Wiechmann²²¹ ist dieser Reaktionsschritt dagegen nicht enthalten. Zum Vergleich wurden zwei Reaktionslösungen angesetzt, wobei eine nach der Inkubation mit Dithiothreitol versetzt wurde. Bei dem anderen Ansatz erfolgte keine Reduktion. Zur Chromatographie wurde aus beiden Reaktionsansätzen zunächst das Aceton im Stickstoffstrom entfernt und die verbleibende wässrige Phase, wie von Seiler und Wiechmann²²¹ beschrieben, mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt zur Trockne gebracht, der Rückstand mit 50 % Acetonitril aufgenommen und der RP-HPLC/UVD_{220nm} zugeführt.

In Abb. 3.97 sind die Chromatogramme der beiden Reaktionsansätze dargestellt. Es sind dabei deutliche Unterschiede zwischen den Syntheseansätzen in Abhängigkeit einer durchgeführten Reduktion erkennbar.

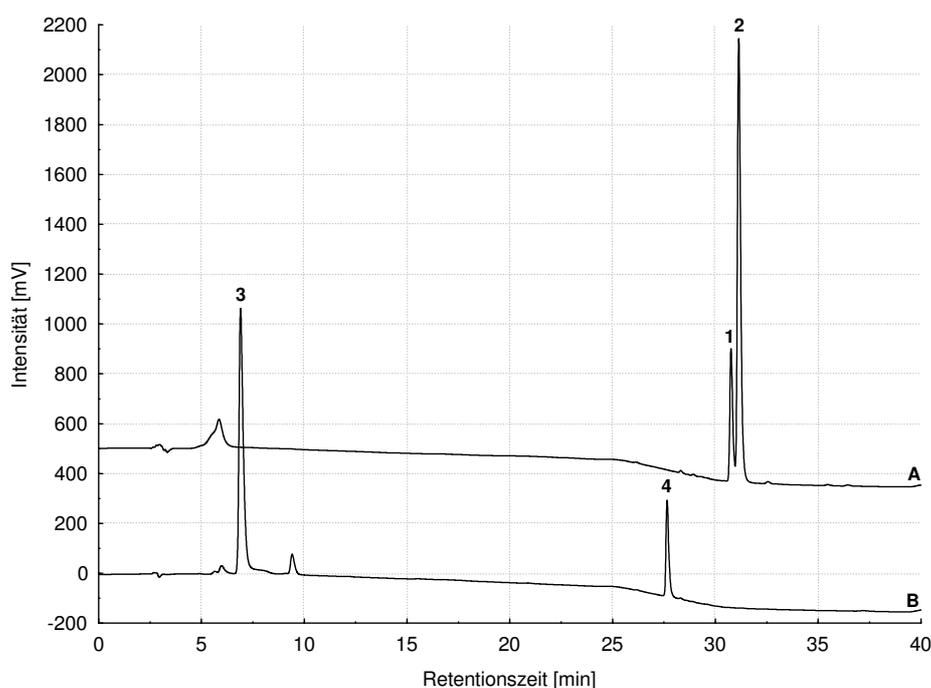


Abb. 3.97: RP-HPLC/UVD_{220 nm} - Chromatogramme des Syntheseansatzes von Dansylcysteamin mit (B) und ohne (A) Reduktion; markierte Verbindungen s. Abb. 3.98; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 10 % B, 20 min 50 % B, 25 min 95 % B, 35 min 95 % B 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Mittels RP-HPLC/ESI-MSD konnten die Hauptverbindungen identifiziert werden (Abb. 3.98).

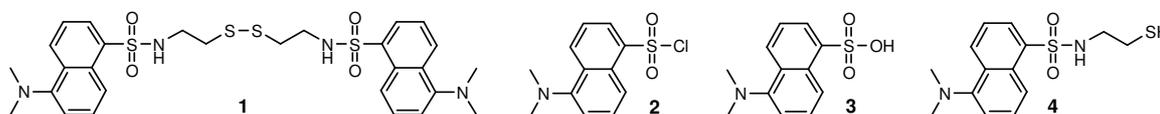


Abb. 3.98: identifizierte Verbindungen der Reaktionsansätze mit und ohne Reduktion (Abb. 3.97)

Es zeigte sich somit, dass in Übereinstimmung mit Schulze und Neuhoff²²² nur durch den Zusatz eines Reduktionsmittels nach erfolgter Inkubation, das gewünschte Produkt erhalten werden konnte. Inwieweit die Umsetzung zum Dansylcysteamin vollständig erfolgte ist aufgrund der UV-Inaktivität des Cysteamins nicht ersichtlich. Das nicht umgesetzte Dansylchlorid wird zur korrespondierenden Säure hydrolysiert.

Durch die Reaktion der beiden Ausgangsverbindungen in unterschiedlichen Molverhältnissen wurde im Anschluss versucht, Informationen über eine mögliche Ausbeuteerhöhung bzw. zum Grad der Umsetzung zu erhalten. Die Auswertung erfolgte dabei über die Peakfläche des Dansylcysteamins. Aus der Abb. 3.99 wird ersichtlich, dass bereits ein zweifacher molarer Überschuss von Dansylchlorid gegenüber Cysteamin zu einer maximalen Ausbeute führte und mit einem fünffachen Überschuss keine weiteren Steigerung erfolgte.

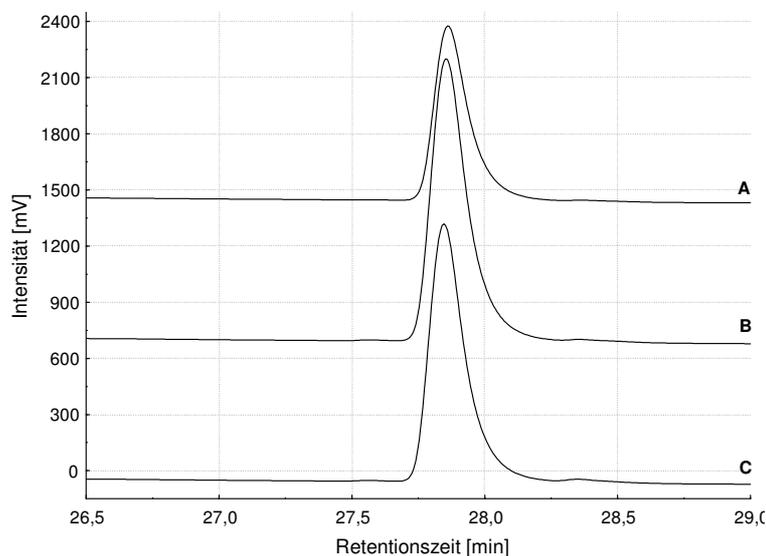


Abb. 3.99: RP-HPLC/UV_{D220nm} – Chromatogramme des Dansylcysteamin bei der Synthese in Abhängigkeit unterschiedlicher molare Verhältnisse von Cysteamin zu Dansylchlorid A...1:1, B...1:2, C...1:5; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 10 % B, 20 min 50 % B, 25 min 95 % B, 35 min 95 % B 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Der Überschuss an Dansylchlorid wird während der Umsetzung, Reduktion und Extraktion zur Dansylsulfonsäure hydrolysiert.²²³ Für die Reindarstellung des Produktes sollte diese möglichst durch Extraktion aus der Lösung entfernt werden. Dabei bestand die Überlegung durch Verwendung einer basischen Lösung die Sulfonsäure durch Salzbildung aus der organischen Phase zu entfernen. Der pH-Wert musste dabei so eingestellt werden, dass die Säuregruppe desprotoniert, die Aminogruppe dagegen protoniert bleibt, um die Bildung eines ladungsneutralen Ions zu verhindern. Bezüglich der Wahl der organischen Phase sollte in diesem Lösungsmittel ein günstiger Verteilungskoeffizient entsprechend des Dansylcysteamins vorliegen. Im Folgenden wurde die Extraktion mit gesättigten Lösungen von NaHCO₃, Na₂CO₃ sowie einem HCO₃⁻/CO₃²⁻-Puffer und somit bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (Abb. 3.100).

In den Chromatogrammen konnten bezüglich des Dansylcysteamins bei keiner Extraktionsmethode Veränderungen im Vergleich zur Aufarbeitung ohne Extraktion beobachtet werden. Dagegen war zu beobachten, dass mit steigendem pH-Wert des Extraktionsmittels die Entfernung der Sulfonsäure aus der organischen Phase umso vollständiger gelang.

²²³ Becker, H.G.O. et al., Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum, 20., bearb. und erw. Aufl., Johann Ambrosius Barth Verlag, Hühlig GmbH, Heidelberg, Leipzig 1996.

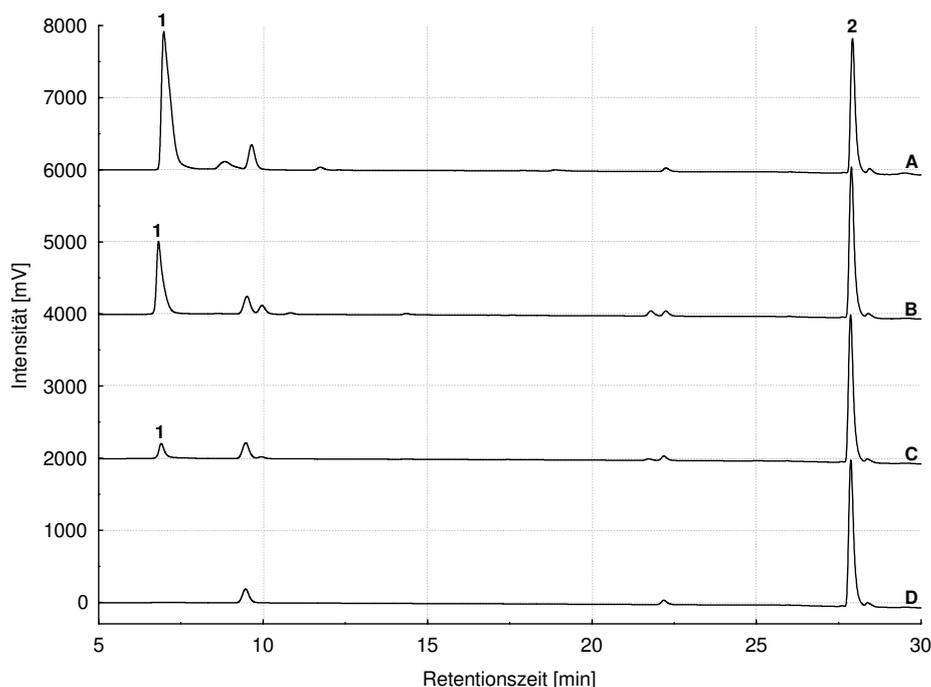


Abb. 3.100: RP-HPLC/UV_{D220nm} - Chromatogramme nach der Extraktion der Dansylsulfonsäure mit gesättigten Lösungen von NaHCO₃ (B), Na₂CO₃ (D) und NaHCO₃/Na₂CO₃ (1:1) (C) im Vergleich ohne Extraktion (A), 1...Dansylsulfonsäure, 2...Dansylcysteamin; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 10 % B, 20 min 50 % B, 25 min 95 % B, 35 min 95 % B 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Zur Darstellung im Halbmikroansatz wurde in Folge der beschriebenen Optimierungsschritte Cysteamin mit Dansylchlorid im Molverhältnis 1 : 2 im schwach basischen Milieu umgesetzt und das entstandene Disulfid mit Dithiothreitol reduziert. Anschließend wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung gewaschen, zur Trockne gebracht und der Rückstand, wie von Seiler und Wiechmann²²¹ beschrieben in Methanol/Wasser umkristallisiert.

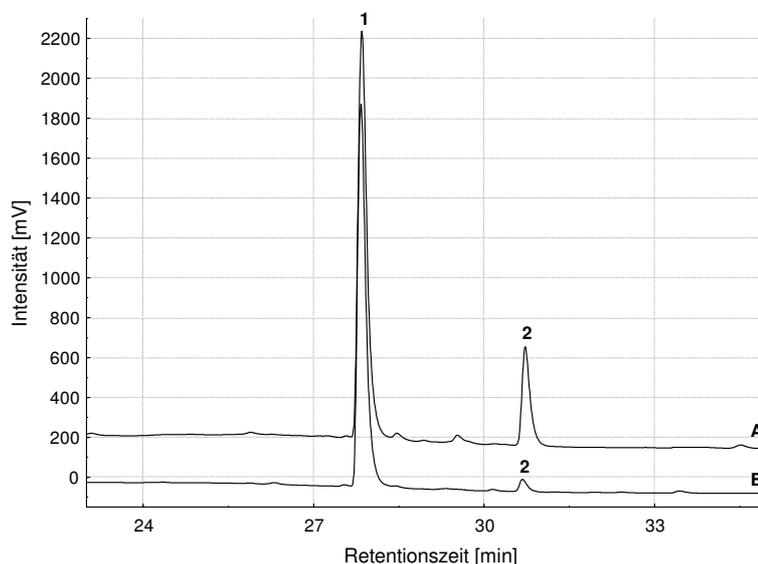


Abb. 3.101: Vergleich der RP-HPLC/UV_{D220nm} - Chromatogramme des Produktspektrums der Darstellung von Dansylcysteamin bei der Aufarbeitung mit (B) und ohne (A) Stickstoffatmosphäre; 1...DansylCyst., 2...Disulfid; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 1 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 10 % B, 20 min 50 % B, 25 min 95 % B, 35 min 95 % B 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Im Zuge der Aufarbeitung, nach der Zugabe des Reduktionsmittels kommt es jedoch vermutlich durch Luftsauerstoff wieder zur Bildung des Disulfides. Um diese Oxidation des Produktes so

gering wie möglich zu halten, wurde die Aufarbeitung weiterer Reaktionsansätze unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dadurch konnte der Gehalt an Disulfid von knapp 20 % auf weniger als 5 % reduziert werden (Abb. 3.101). Die optimierte Methode zur Darstellung von Dansylcysteamin sowie die strukturanalytische Charakterisierung wird unter Kapitel 5.3.9 zusammengefasst.

3.3.2 Derivatisierung von Epoxiden mit Dansylcysteamin

Die Derivatisierung mit Dansylcysteamin sollte vor allem die Identifizierung als auch die Quantifizierung der aliphatischen Epoxidverbindungen erleichtern. Durch die Reaktion der Oxirangruppen mit dem Thiol erhält die Substanz chromophore Eigenschaften und kann leicht mittels UVD detektiert werden.

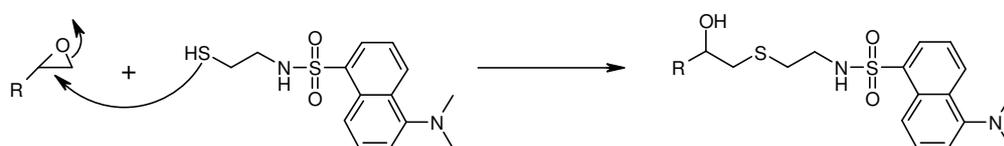


Abb. 3.102: Derivatisierungsreaktion von Epoxidverbindungen mit Dansylcysteamin

Aufgrund der ähnlichen Derivatisierung von Epoxiden mit Cysteamin (Kap. 3.2.1) wurden die Derivatisierungsbedingungen dieser Methode auf die Umsetzung von Dansylcysteamin mit aliphatischen Epoxiden übertragen. Die Derivatisierung wurde somit zunächst in 50 % Ethanol, bei einem pH-Wert von 9 für 60 min bei 50 °C durchgeführt. Das Derivatisierungsreagenz wurde in einer Konzentration von 4 g/l und gegenüber der Anzahl an Epoxidgruppen einer Probe, abgeschätzt über das Epoxidäquivalent, etwa in einem 20-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Zur Optimierung der Derivatisierung wurde der Reaktivverdünner Hexandiol diglycidylether (HDDGE) gewählt. Gleichzeitig wurde Phenylglycidylether (PGE) als Interner Standard verwendet. Die Detektion der Derivate erfolgte im Absorptionsmaximum des Dansylcysteamins bei 250 nm. Die Fläche des UV-aktiven Internen Standards kann bei dieser Wellenlänge vernachlässigt werden, da er bei 250 nm ein Absorptionsminimum besitzt.

Im Chromatogramm des derivatisierten HDDGE's konnten neben dem Derivatisierungsreagenz, dessen Disulfid und dem umgesetzten Internen Standard fünf Derivate des Reaktivverdünners mittels RP-HPLC/ESI-MSD identifiziert werden (Abb. 3.103).

Dabei zeigte sich, dass sowohl der HDDGE als auch sein Epichlorhydrinderivat HDDGE·ECH einfach und zweifach derivatisiert vorlagen. Die Derivatisierung verlief somit nicht vollständig. Für die weitere Methodenoptimierung erfolgte die Orientierung sowohl an den Internen Standard als auch an den Derivaten von HDDGE und HDDGE·ECH.

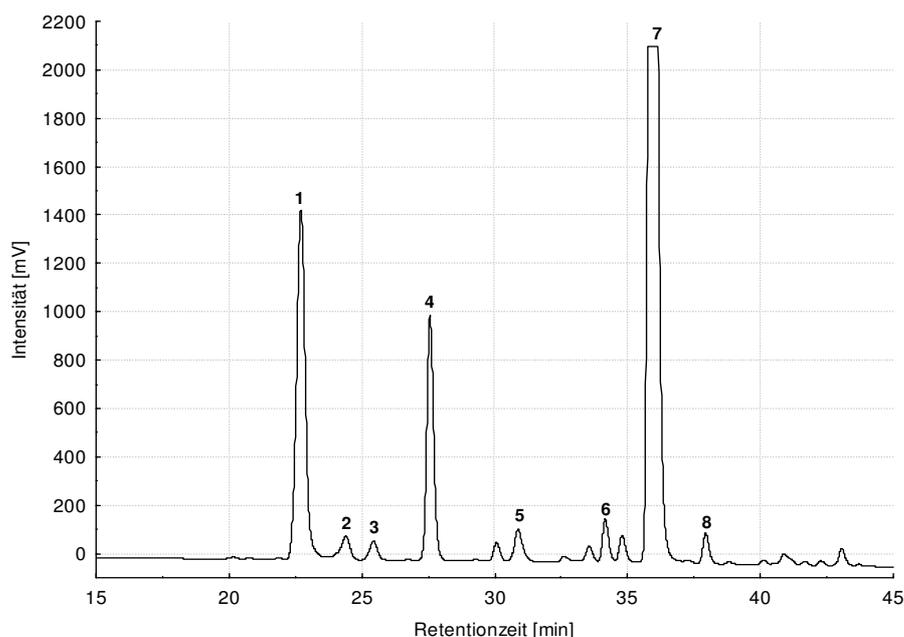


Abb. 3.103: RP-HPLC/UV_{D250nm} – Chromatogramm nach Derivatisierung des Reaktivverdünners HDDGE mit Dansylcysteamin, 1...DansylCyst., 2...HDDGE·HCl·DansCyst., 3...HDDGE·DansCyst., 4...PGE·DansCyst. 5...HDDGE·ECH·DansCyst., 6...HDDGE·2DansCyst., 7...DansylCyst.-Disulfid, 8...HDDGE·ECH·2DansCyst.; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Das für die Derivatisierung der Epoxidverbindungen mit Cysteamin verwendete 50 %ige Ethanol ist bezüglich seines Lösungsvermögens des lipophileren Dansylcysteamin grenzwertig. Um sicher zu gehen, dass das Derivatisierungsreagenz während der Umsetzung in Lösung bleibt und somit komplett der Reaktion zur Verfügung steht, wurde der Einfluss sechs verschiedener organischer Lösungsmittel bzw. -mischungen untersucht (Abb. 3.104).

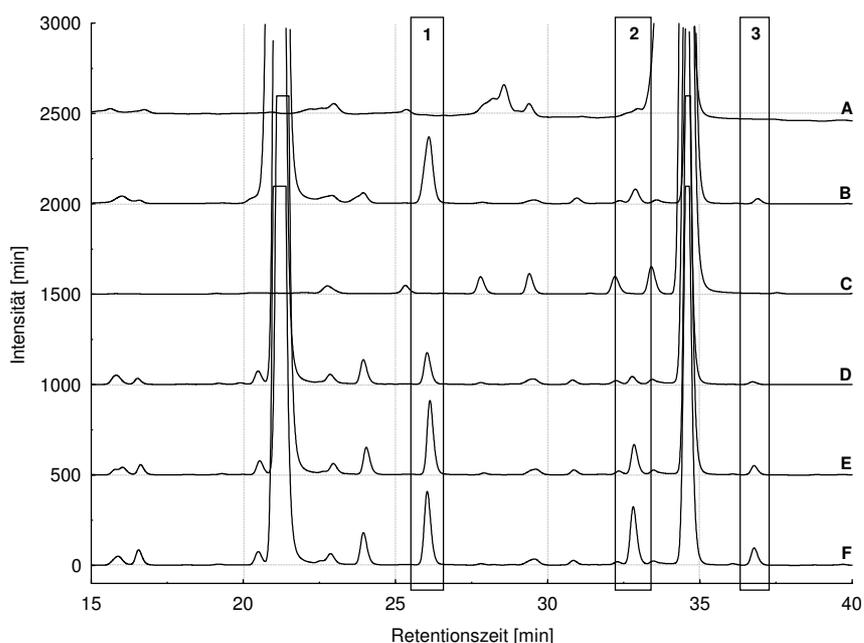


Abb. 3.104: RP-HPLC/UV_{D250nm} – Chromatogramme der Derivatisierung von HDDGE in unterschiedlichen Lösungsmitteln, A...10 % EtOH, B...75 % EtOH, C...50 % THF, D...25 % DMF, E...25/25 % DMF/EtOH, F...10/40 % DMF/EtOH 1...PGE·DansCyst., 2...HDDGE·2DansCyst., 3...HDDGE·ECH·2DansCyst.; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Durch die Erhöhung des Ethanolanteils konnten keine besseren Resultate erreicht werden. Aber auch die Verwendung von 50 %igem THF oder 50 %igem DMF zeigten keinen positiven Einfluss auf die Umsetzung des Reaktivverdünners, obwohl beide Lösungsmittel im Vergleich zum Ethanol eine geringere Polarität besitzen. Analog zur Derivatisierung mit Cysteamin spielt auch hier möglicherweise die Solvataion der entstehenden Alkoholatgruppe durch polare Lösungsmittel und die damit verringerte Aktivierungsenergie für die nukleophile Substitution des Derivatisierungsreagenzes eine entscheidende Rolle.⁹ Das beste Derivatisierungsergebnis wurde mit einer Mischungen von Ethanol, DMF und Wasser im Verhältnis 40 : 10 : 50 (v/v/v) erzielt. Der Ethanol/Wasseranteil sorgt dabei für die notwendige Polarität für den nukleophilen Angriff des Dansylcysteamins, während das DMF als guter Lösungsvermittler das Reagenz in Lösung hält.

Für die Optimierung der Methode in Hinblick auf eine vollständige Umsetzung aller freien Epoxidgruppen wurde wieder ein statistischer Versuchsplan im Box-Behnken-Design durchgeführt. Dazu wurde ein reduzierter 3^3 - Versuchsplan mit insgesamt 15 Versuchen und den Einflussfaktoren pH-Wert, Temperatur und Reaktionszeit aufgestellt. Die Variation der Faktoren erfolgte ausgehend von den bereits verwendeten Ausgangsbedingungen (pH-Wert 9, T = 50 °C, t = 60 min) (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Faktorstufen der Einflussfaktoren für die statistische Versuchsplanung

Einflussfaktoren	Faktorstufen		
pH-Wert	9	10,5	12
Temperatur [°C]	50	60	70
Zeit [min]	60	90	120

Als Zielgröße wurden die zweifach derivatisierten Derivate von HDDGE und HDDGE·ECH gewählt. Im Paretoogramm beider Zielgrößen wird ersichtlich, dass der pH-Wert den stärksten Einfluss (linear) auf die Derivatisierung hat (Abb. 3.105).

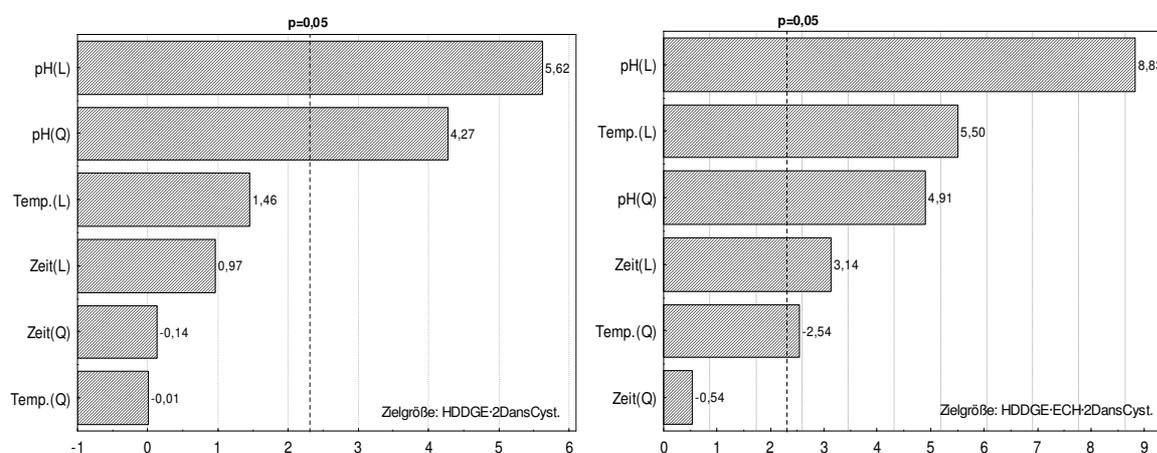


Abb. 3.105: Paretoogramme der Optimierung der Derivatisierung mit Dansylcysteamin für die Zielgrößen HDDGE·2DansCyst. und HDDGE·ECH·2DansCyst.

Bei einem pH-Wert von 10,5 erreichte die Peakfläche für HDDGE-2DansCyst. ein Maximum (Abb. 3.106). Gleichzeitig konnte kein einfach derivatisierter HDDGE detektiert werden, womit von einer vollständigen Derivatisierung auszugehen ist. Bei der Umsetzung des einfachen Epichlorhydrinderivates haben neben dem pH-Wert auch die Temperatur und die Reaktionszeit einen Einfluss auf das Ergebnis der Derivatisierung (Abb. 3.105). Bezüglich des pH-Wertes durchläuft aber auch die bei der Umsetzung von HDDGE·ECH resultierende Peakfläche bei einem Wert von 10,5 ein Maximum. Zusätzlich zu den beiden Zielgrößen konnte nach der Optimierung zusätzlich Hexandiolmonoglycidylether (HDMGE) in nennenswerter Intensität detektiert werden.

Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden die Reaktionsbedingungen für die Derivatisierung mit Dansylcysteamin festgelegt auf: $T = 70\text{ °C}$, $t = 60\text{ min}$ und $\text{pH } 10,5$.

Ein weiterer Optimierungsansatz für die Derivatisierungsmethode war die Beseitigung des Dansylcysteamins und dessen Disulfids aus dem Reaktionsansatz nach der Umsetzung. Beide Verbindungen eluieren im Chromatogramm im Bereich der Derivate, wodurch deren Identifizierung und Quantifizierung erschwert wird. Aufgrund der Thiolgruppe des Derivatisierungs-

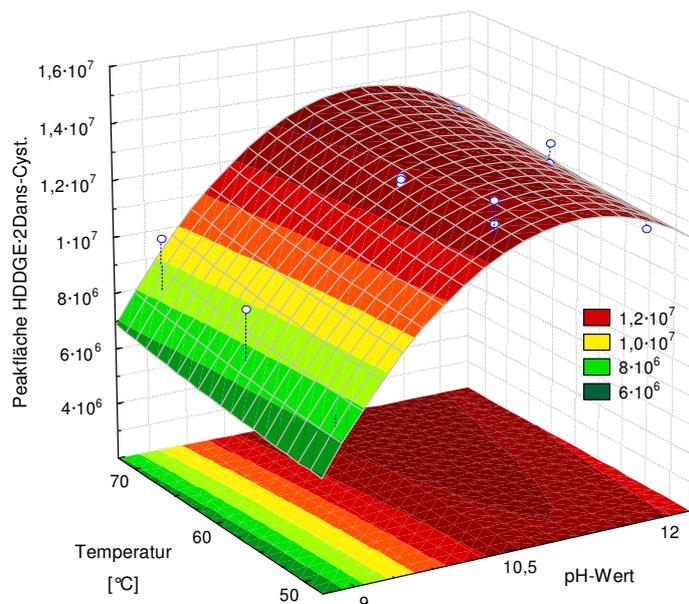


Abb. 3.106: 3D-Flächenplot der Zielgröße HDDGE-2DansCyst in Abhängigkeit der Temperatur und des pH-Wertes (Reaktionszeit 60 min)

reagenzes wurde eine Fällung dieser Verbindung mit einem Metallsalz angestrebt. Zur Entfernung des Disulfids mussten jedoch, zunächst die über Disulfidbrücken blockierten Schwefelgruppen durch Reduktion des Disulfids der Präzipitation zugänglich gemacht werden. Als Reduktionsmittel wurden neben Dithiothreitol, welches jedoch ebenfalls Thiolgruppen enthält, Natriumborhydrid und Ascorbinsäure zum Vergleich eingesetzt. Während mit Ascorbinsäure keinerlei Veränderung im Verhältnis Sulfid : Disulfid zu beobachten war, zeigte sich bei der Verwendung von Natriumborhydrid eine deutliche Verschiebung zum Dansylcysteamin. Eine vollständige Reduktion des Disulfids konnte jedoch nur beim Einsatz von Dithiothreitol verzeichnet werden. Eine Beeinflussung der Derivate durch die Zugabe des Reduktionsmittels war nicht erkennbar.

Für die anschließende Fällung wurde, in Anlehnung an die Sulfidfällung von Metallen und aufgrund des geringen Löslichkeitsproduktes von Ag_2S ($L_{20\text{ °C}} = 1,0 \cdot 10^{-49} \text{ mol}^3/\text{l}^3$) bezüglich des Sulfids, Silbernitrat als Fällungsreagenz gewählt.⁴³ Die Konzentration an Fällungsmittel wurde dabei so gewählt, dass gegenüber dem Derivatisierungsreagenz und dem zur Reduktion des Disulfides zugesetzten Dithiothreitol ein ausreichender molarer Überschuss besteht.

In Abb. 3.107 ist das Ergebnis der Reduktion und der Fällung im Vergleich zum unbehandelten Reaktionsansatz dargestellt. Bis auf einen geringen Gehalt an Disulfid, der die Identifizierung und Quantifizierung nicht behindert, konnte das Derivatisierungsreagenzes somit erfolgreich entfernt

3 Ergebnisse und Diskussion

werden. Bezüglich der Derivate kommt es jedoch bei der Fällung mit AgNO_3 zu Verlusten von etwa 20 %. Es ist dabei davon auszugehen, dass die Derivate durch Adsorption an den Niederschlag aus der Lösung entfernt werden.

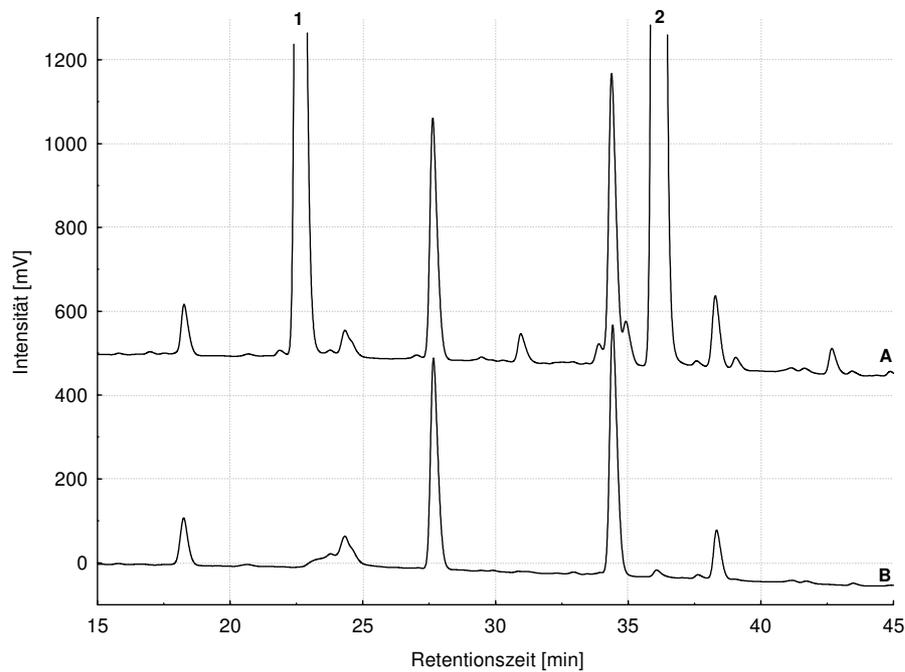


Abb. 3.107: Vergleich der RP-HPLC/UVD_{250nm} - Chromatogramme der Derivatisierung des HDDGE's ohne und nach Reduktion und Fällung zur Entfernung des Derivatisierungsreagenzes; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B, 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Um diese Effekte zu verringern, wurde im Folgenden die Reduktion und Fällung des Disulfids bzw. des Dansylcysteamins mit unterschiedlicher Lösungsmittelmenge vorgenommen. Bei gleicher Konzentration erfolgte dieser Arbeitsschritt im Vergleich zur ursprünglichen Methode zusätzlich im doppelten und im vierfachen Lösungsmittelvolumen (Abb. 3.108). D. h. es wurde der Reaktionsansatz nach der Inkubation 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8 verdünnt.

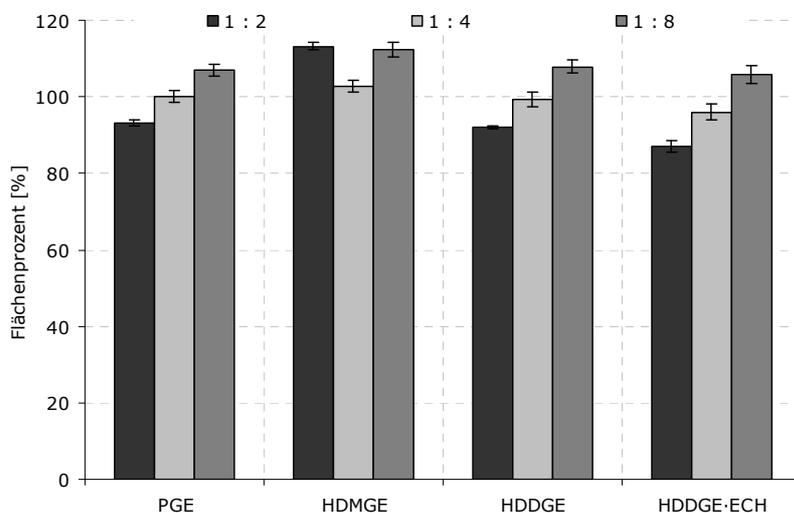


Abb. 3.108: Flächenprozent des internen Standards und der Derivate bezüglich den Peakflächen ohne Reduktion und Fällung (= 100 %)

Dabei zeigte sich deutlich, dass mit zunehmender Menge an Lösungsmittel die Flächenprozentage sowohl der einzelnen Derivate als auch des Internen Standards PGE signifikant zunehmen. Im Folgenden wurde daher die Reduktion und Fällung in einer 1:8 verdünnten Lösung vorgenommen.

Die Quantifizierung der einzelnen aliphatischen Epoxide erfolgte zunächst im UV bei 250 nm über die Kalibrierung des Derivatisierungsreagenzes. Es wurde dabei angenommen, dass sich die UV-Absorption der Derivate gegenüber dem reinen Dansylcysteamin nicht verändert. Der Interne Standard wurde dagegen separat unter Einbeziehung der Umsetzung kalibriert und mit einer Wiederfindung von durchschnittlich 135 % bestimmt. Unsicherheitsfaktor dieser Quantifizierung ist die UV-Absorption der Derivate. Um die Ergebnisse unabhängig von den spektroskopischen Eigenschaften sowie der Flüchtigkeit der Verbindungen zu überprüfen, wurde die Bestimmung zusätzlich über die Detektion mittels CLND vorgenommen. Aufgrund der N₂-spezifischen Detektion wird dabei nur das Derivatisierungsreagenz erfasst, eine Beeinflussung durch die derivatisierte Verbindung erfolgt nicht. Die Kalibrierung des Stickstoffgehaltes erfolgte über Coffein. Der Interne Standard PGE konnte mit einer Wiederfindung von 108 % bestimmt werden. Im Vergleich zwischen den über die Absorption im UV bei 250 nm und den über die Detektion mittels CLND bestimmten Werten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 3.109). Die Ergebnisse der UV-Detektion konnten somit bestätigt werden. Die erhöhte Wiederfindung des Internen Standards im UV wird durch die Berechnung der Gehalte über die Wiederfindung des Internen Standards ausgeglichen.

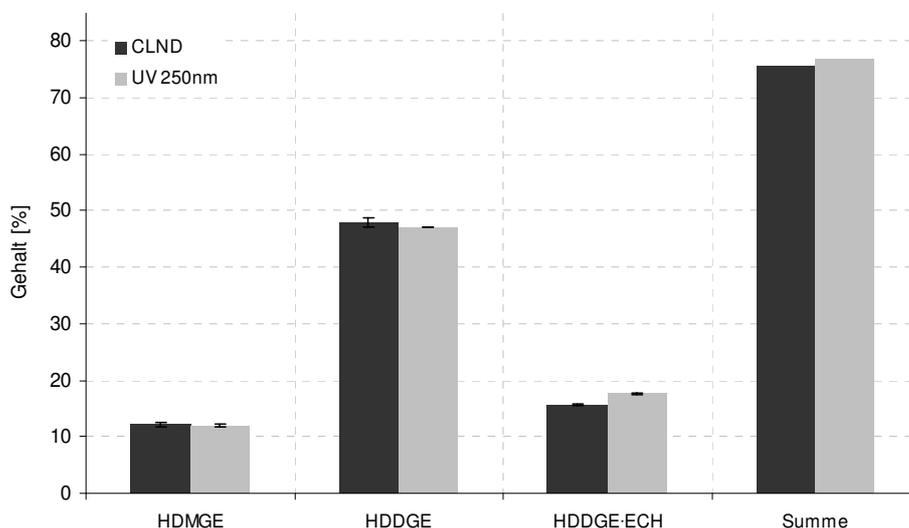


Abb. 3.109: Vergleich der ermittelten Gehalte der einzelnen Verbindungen über die Detektion mittels UVD_{250nm} und CLND

Die optimierte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von epoxidhaltigen Verbindungen über die Derivatisierung mit 5-Dimethyl-amino-N(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin) wird unter Kapitel 5.3.8 zusammengefasst.

3.3.3 Analyse der in der dermatologischen EPOX-Studie 2000 eingesetzten Epoxidharze und Reaktivverdünner

Bisphenol A - Harz

Auf dieses in der dermatologischen Studie von Geier et al.⁸¹ eingesetzte Bisphenol A – Harz *Araldit MY 740* zeigte reichlich die Hälfte (55,2 %) der untersuchten Patienten eine positive Reaktion im Patchtest. Für die Analytik dieser Harze

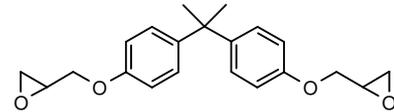


Abb. 3.110: BADGE

war die Detektion über den ELSD bzw. die Quantifizierung mittels Derivatisierung mit Dansylcysteamin aufgrund der vorliegenden chromophoren Eigenschaften des Rohstoffes nicht nötig.

Über die Titration nach DIN EN ISO 3001 wurde für das Harz ein Epoxidäquivalent von (192 ± 3) g bestimmt (Kap. 5.4.5).¹¹⁶ BADGE (Abb. 3.110) als monomere Grundeinheit dieses Harzes, mit einer molaren Masse von 340 Da und zwei Epoxidgruppen im Molekül besitzt eine Äquivalentmolmasse von 170 Da. Daraus ist ersichtlich, dass das vorliegende Harz überwiegend auf BADGE basiert, in einem geringen Anteil aber auch höhermolekulare Verbindungen vorliegen. Dies bestätigt sich auch in dem UVD_{275nm}-Chromatogramm des Harzes (Abb. 3.111). Neben BADGE konnten auch in geringer Intensität dessen hydrolysiertes Derivat sowie die dimere und trimere Verbindung nachgewiesen werden. Entsprechend dem Peakflächenverhältnis beträgt der prozentuale Anteil des Monomers knapp 85 %.

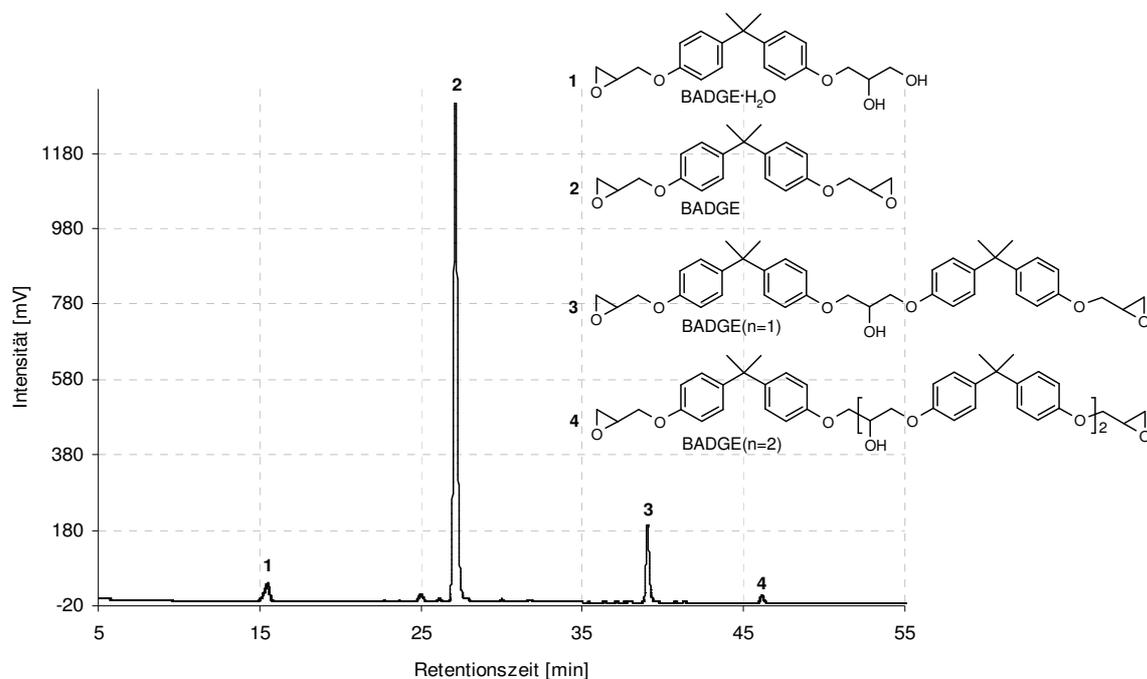


Abb. 3.111: RP-HPLC/UVD_{275nm} - Chromatogramm des BPA-Harzes *Araldit MY 740* und dessen identifizierte Verbindungen, chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Bisphenol F - Harz

Auf das zweite in der EPOX-Studie 2000 verwendete, auf Bisphenol F bzw. BFDGE (Abb. 3.112) basierende Epoxidharz reagierten 43,7 % der Patienten positiv im Patchtest.⁸¹ Im Vergleich zum BPA-Harz konnte eine

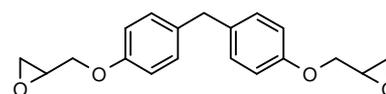


Abb. 3.112: BFDGE

ähnliche Zusammensetzung ermittelt werden. Auch hier lag das selbst ermittelte Epoxidäquivalent von (169 ± 3) g (Herstellerangabe 165 – 173 g) etwas über der Äquivalentmolmasse des Monomers von 156 Da (Kap. 5.4.5). Im UVD_{275nm} - Chromatogramm konnten demzufolge neben BFDGE auch andere Derivate wie das einfach hydrolysierte BFDGE, das Dimer aber auch ein Epichlorhydrinaddukt von BFDGE sowie 3-Ring-NOGE-Isomere identifiziert werden (Abb. 3.113).

Anhand des Peakmusters im Chromatogramm ist ersichtlich, dass isomere Verbindungen vorliegen. Die BFDGE-Isomere eluieren dabei in der Reihenfolge: p,p'-BFDGE, o,p'-BFDGE und o,o'-BFDGE.¹³² Die in Abb. 3.113 dargestellten Verbindungen sind somit nur als Strukturvorschläge zu verstehen. Das von Ponten et al.¹³² bestimmte Isomerenverhältnis von 2,5 : 2,7 : 1 konnte bestätigt werden. Entsprechend dem Peakflächenverhältnis beträgt der prozentuale Anteil des isomeren Monomers auch bei diesem Harz knapp 85 %. Ponten und seine Mitarbeiter¹³² bestimmten für das gleiche Material, jedoch über Standardkalibration einen Anteil an BFDGE von 75 %.

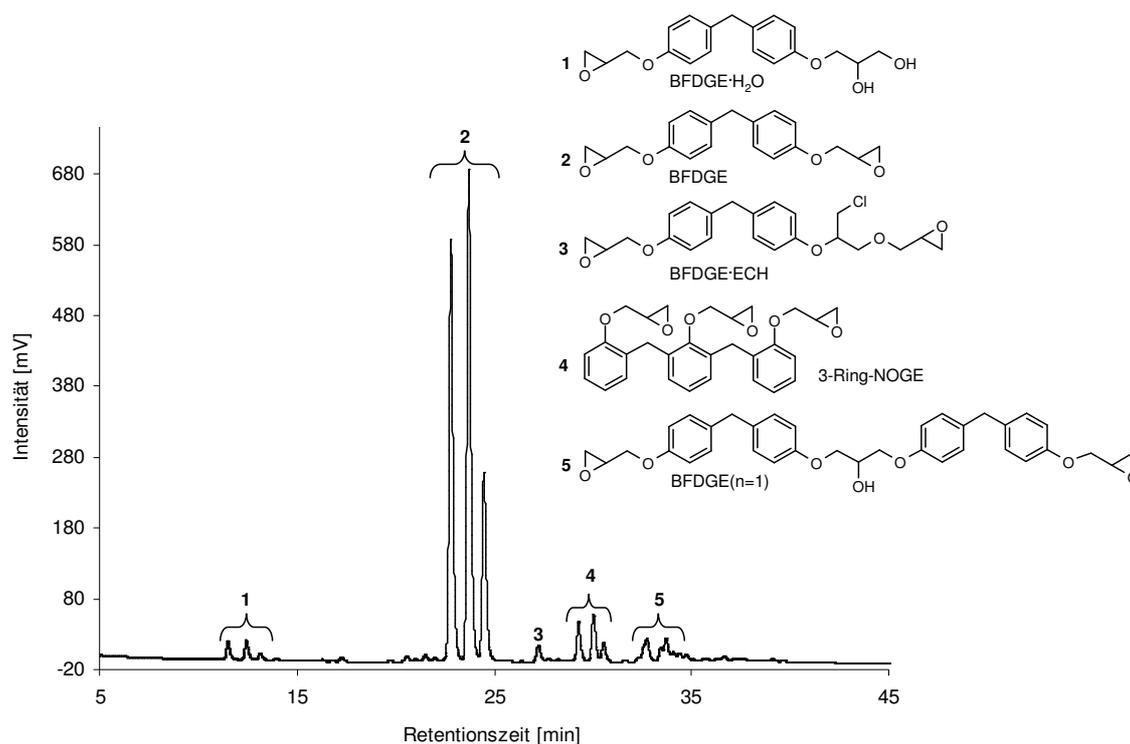


Abb. 3.113: RP-HPLC/UVD_{275nm} - Chromatogramm des BPA-Harzes *Epikote 862* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Hexandioldiglycidylether (HDDGE)

Der Reaktivverdünner HDDGE (Abb. 3.114) stand von drei verschiedenen Firmen zur Verfügung. Von diesen wurde das Material *Araldit DY-H* in der EPOX 2000 - Studie von Geier et al.⁸¹ verwendet, auf welches knapp 20 % der Patienten

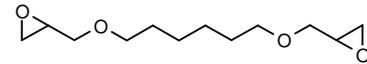


Abb. 3.114: HDDGE

mit der Ausbildung von Kontaktekzemen reagierten. Bei der chromatographischen Analyse zeigt sich, dass es sich bei diesem Rohstoff um eine Mischung des Reaktivverdünners mit einem niedermolekularen BPA-Harz handelt. So konnten neben den Verbindungen des Reaktivverdünners auch BADGE, BADGE·H₂O und BADGE(n=1) nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung über die Derivatisierung mit Dansylcysteamin erfolgte aufgrund dieser Mischung nicht. Zudem ergeben sich aus den Ergebnissen der EPOX 2000 - Studie Zweifel darüber, ob der Rohstoff im Epikutantest und das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Material in ihrer Zusammensetzung identisch waren.

Ausführlicher analysiert wurde das Material *Polypox R 18*. Im Datenblatt des Herstellers wird für diesen Rohstoff ein Epoxidäquivalent von (154 ± 7) g angegeben. Dies entspricht etwa dem mittels Titration nach DIN EN ISO 3001 ermittelten Epoxidäquivalent von (143 ± 3) g (Kap. 5.4.5).¹¹⁶ Die Äquivalentmasse bezüglich der im Molekül enthaltenen Epoxidgruppen beträgt 115 Da. Daraus lässt sich schließen, dass wiederum neben dem reinen HDDGE auch Oligomere bzw. nicht vollständig epoxidierte Monomere enthalten sind. Entscheidend für die Detektion der Verbindungen mittels ELSD ist deren Flüchtigkeit. Einfluss darauf kann über die Verdampftemperatur des Detektors genommen werden. Bereits bei der Absenkung der Temperatur von 45 °C auf 30 °C konnten z. T. wesentliche Veränderungen in der Intensität der Signale beobachtet werden. Im Folgenden wurden die Epoxidrohstoffe daher bei einer Verdampftemperatur von 30 °C chromatographiert. Im Chromatogramm des Rohstoffes *Polypox R 18* konnten fünf Verbindungen identifiziert werden (Abb. 3.115).

Neben dem HDDGE weist das Epichlorhydrinaddukt HDDGE·ECH mit enthaltenen nicht hydrolysiertem Chlor eine ähnliche Signalintensität auf. Beide Verbindungen sind berechnet über das Peakflächenverhältnis mit etwa 51,5 % (HDDGE) und ca. 45,5 % (HDDGE·ECH) die beiden Hauptkomponenten.

Die in der Abb. 3.115 dargestellten Verbindungen sind, aus den mittels RP-HPLC/ESI-MSD bestimmten molaren Massen, erstellte Strukturvorschläge. So können z. B. 1,3 Chlorhydrine auch als 1,2 Chlorhydrine in einer Verbindung vorliegen.

Nach der Derivatisierung mit Dansylcysteamin konnte neben den beiden genannten Hauptverbindungen auch das Derivat des Monoglycidylether des Hexandiols (HDMGE) erfasst werden. Ohne Umsetzung war diese Verbindung aufgrund ihrer Flüchtigkeit im ELSD nicht detektierbar. Die anderen nur in Spuren enthaltenen HDDGE-Derivate konnten nach der Derivatisierung nicht nachgewiesen werden.

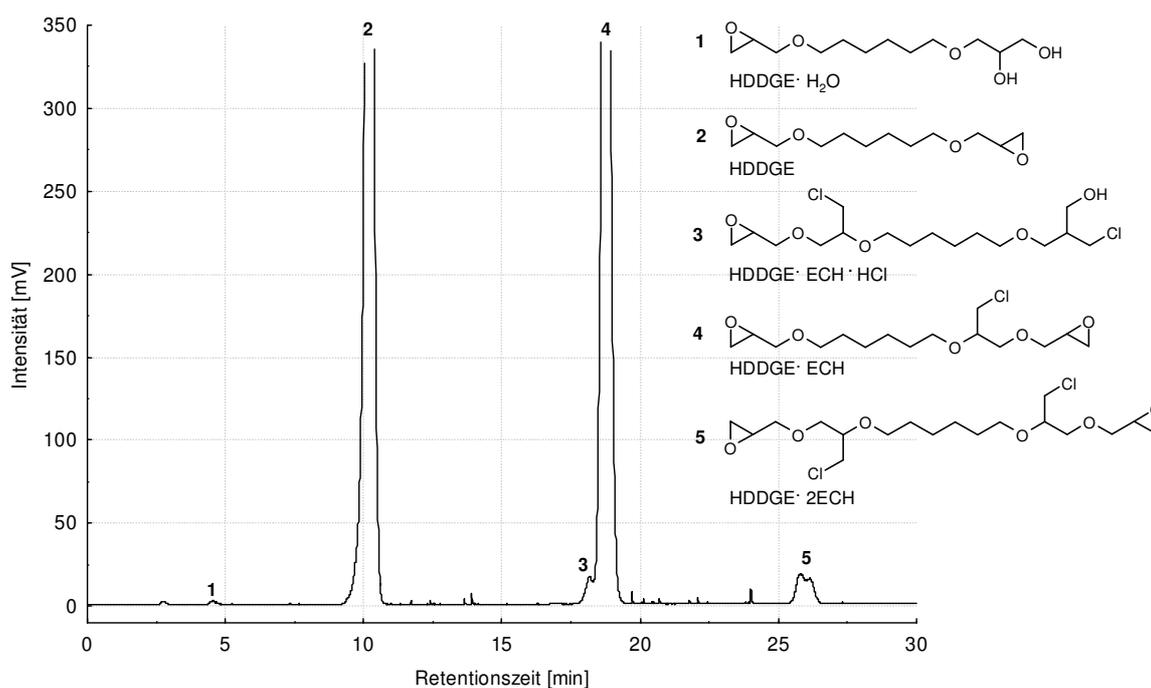


Abb. 3.115: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des HDDGE's *Polypox R 18* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Der Gehalt des HDDGE's im Rohstoff wurde sowohl über die Detektion im UV als auch mittels CLND zu etwa 47 % bestimmt (Tab. 3.18). Das Epichlorhydrinaddukt HDDGE·ECH und der HDMGE haben dagegen am gesamten Rohstoff nur einen Anteil von etwa jeweils 15 %. Damit zeigt sich im Vergleich zu den Werten ohne Derivatisierung, dass trotz Verringerung der Verdampfer Temperatur des ELSD's, die Response der Verbindungen aufgrund der Flüchtigkeit vermindert ist. Die über das Peakflächenverhältnis im ELSD ermittelten prozentualen Anteile der Verbindungen liefern somit keine verlässlichen Ergebnisse.

Tab. 3.18: Gehalte der einzelnen Verbindungen des HDDGE's *Polypox R 18* bestimmt über $\text{UVD}_{250\text{nm}}$ und CLND

	Gehalt $\text{UV}_{250\text{nm}}$ [%]	Gehalt CLND [%]
HDMGE	12,0 ± 0,3	12,1 ± 0,1
HDDGE	47,1 ± 0,1	48,0 ± 0,8
HDDGE·ECH	17,6 ± 0,1	15,6 ± 0,1
Σ detektierbar	76,7 ± 0,5	75,7 ± 1,0
nicht detektierbar	23,3 ± 0,5	24,3 ± 1,0

Auch in dem dritten HDDGE-Reaktivverdünner *Bakelite EPD HD* ist der reine HDDGE ausgehend vom Peakflächenverhältnis des ELSD-Chromatogramms eine Hauptkomponente. Daneben sind außerdem noch Oligomere wie HDDGE(n=1), deren HCl- und Epichlorhydrinaddukte und auch Hexandioltriglycidylether (HDTGE) enthalten.

Trimethylolpropantriglycidylether (TMPTGE)

Von diesem Reaktivverdünner (Abb. 3.116) lagen 3 Materialien von verschiedenen Firmen vor. Davon wurde der Rohstoff *Bakelite EPD TP* in den Epikutantests der EPOX-Studie 2000 verwendet und bei 2,3 % der untersuchten Personen positiv in dieser dermatologischen Untersuchung getestet.⁸¹ Die Epoxidäquivalente der einzelnen Reaktivverdünner werden von den Herstellern mit etwa 140 g angegeben (Kap. 5.4.5). Diese Angaben konnten mit den selbst bestimmten Werten bestätigt werden. Bei einem reinen nur aus TMPTGE bestehenden Reaktivverdünner würde die epoxidgruppenbezogene Äquivalentmasse 77 Da betragen. Diese große Abweichung zeugt wiederum davon, dass höhermolekulare Verbindungen und nicht vollständig epoxidierte Monomere ebenso Bestandteil der Rohstoffe sein müssen. Dies bestätigte sich in den ELSD-Chromatogrammen. In Abb. 3.117 ist das Chromatogramm des Studienmaterials (*Bakelite EPD TP*) dargestellt. Die anderen beiden Rohmaterialien zeigten das gleiche Peakmuster. In allen drei Rohstoffen konnten mittels RP-HPLC/ESI-MSD 8 TMPTGE-Derivate identifiziert werden (Abb. 3.118).

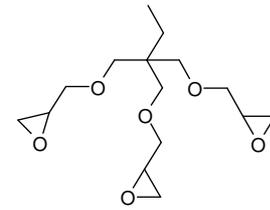


Abb. 3.116: TMPTGE

Auch bei dieser Studiensubstanz ist das einfache Epichlorhydrin-Addukt [6] neben dem reinen TMPTGE [3] im Chromatogramm des ELSD's Hauptbestandteil.

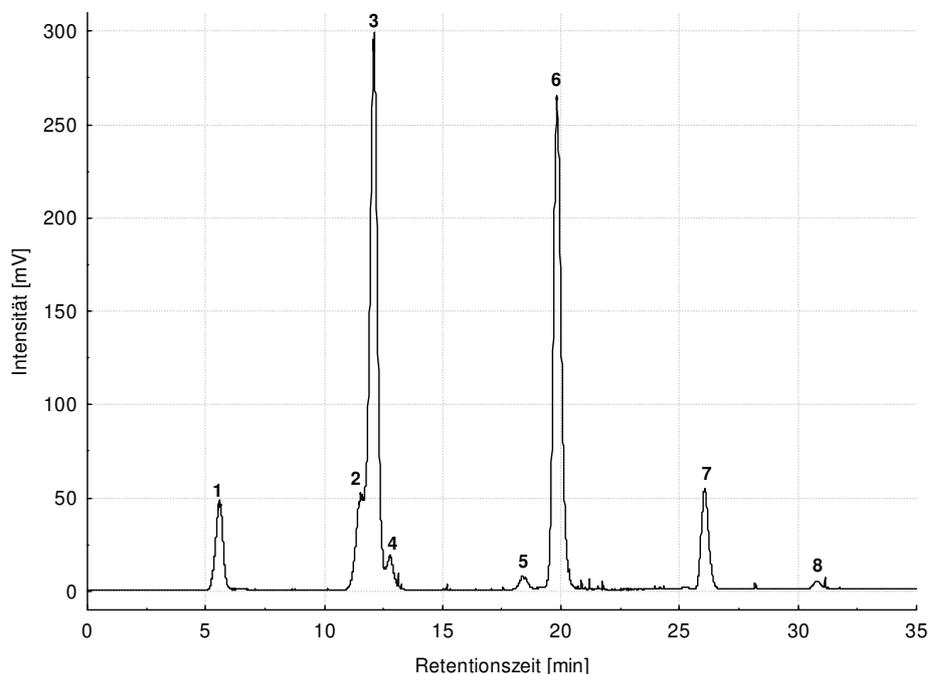


Abb. 3.117: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des Reaktivverdünners TMPTGE *Bakelite EPD TP*, für die markierten Peaks konnten Strukturvorschläge erstellt werden; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ m, 250 x 3 mm

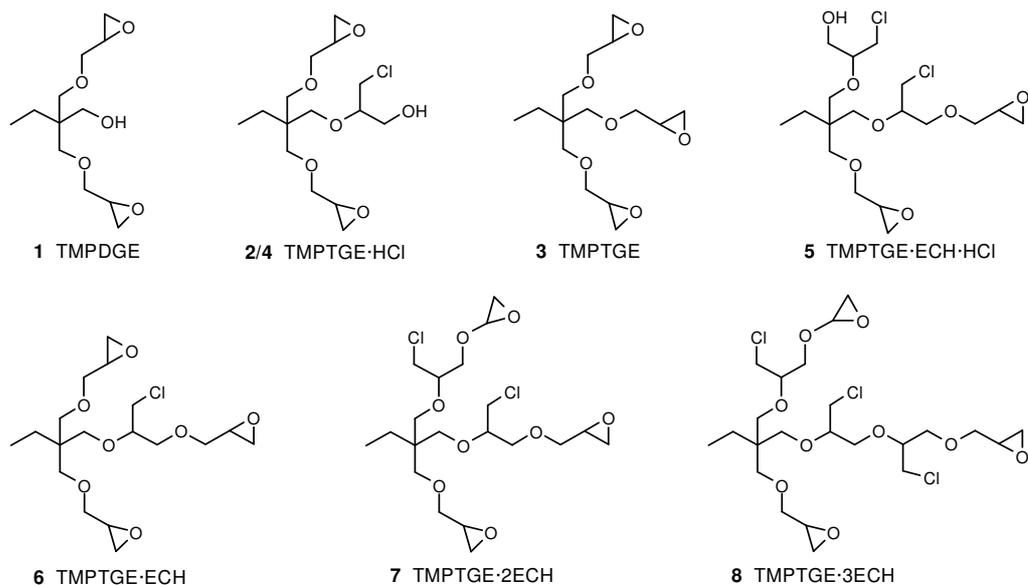


Abb. 3.118: Strukturvorschläge für die im Chromatogramm Abb. 3.117 markierten Peaks

Dieses Ergebnis konnte, allerdings weniger deutlich bei der Derivatisierung mittels Dansylcysteamin bestätigt werden (Tab. 3.19). Dabei liegen die mittels UV-Detektion ermittelten Ergebnisse leicht über denen des CLND's. Tendenziell wurden jedoch mit beiden Detektionsmethoden ähnliche Werte bestimmt. Ebenso wie beim HDDGE waren auch bei diesem Reaktivverdünner nicht alle der identifizierten Substanzen erfassbar. Die Differenz des prozentualen Anteils des reinen TMPTGE's zu den anderen enthaltenen Verbindungen ist im Vergleich zum HDDGE wesentlich geringer. So wurde für den reinen TMPTGE ein Gehalt von knapp 25 % bestimmt. Nur etwa 5 % geringer ist der prozentuale Anteil des Epichlorhydrinderivates TMPTGE·ECH. In Summe konnten über 70 % der Zusammensetzung des Reaktivverdünners aufgeklärt werden.

Tab. 3.19: Gehalte der einzelnen Verbindungen des TMPTGE's *Bakelite EPD TP* bestimmt über UVD_{250nm} und CLND

	Gehalt _{UV250nm} [%]	Gehalt _{CLND} [%]
TMPDGE	12,1 ± 0,1	10,9 ± 0,3
TMPTGE·HCl	15,4 ± 0,4	13,0 ± 0,3
TMPTGE	23,2 ± 0,3	22,4 ± 0,5
TMPTGE·ECH	18,0 ± 0,2	15,0 ± 0,7
TMPTGE·2ECH	8,1 ± 0,2	6,6 ± 0,1
Σ detektierbar	76,8 ± 1,2	68,6 ± 1,9
nicht detektierbar	23,2 ± 1,2	31,4 ± 1,9

Für die beiden nicht in der Studie eingesetzten TMPTGE basierenden Reaktivverdünner konnten die fünf in der Tabelle aufgeführten Derivate ebenfalls quantifiziert werden (Kap. 5.4.4). Auch diese Rohstoffe bestehen zu etwa 70 % aus diesen 5 Verbindungen. Insgesamt waren im Gegensatz zu

den HDDGE basierenden Reaktivverdünnern nur geringe Abweichungen in der prozentualen Zusammensetzung der 3 vorliegenden Rohmaterialien zu beobachten.

C12/C14-Alkylglycidylether (C12/C14-AGE)

Von vier vorliegenden auf C12- und C14-Alkylglycidylether (Abb. 3.119) basierenden Reaktivverdünnern wurde in der EPOX-Studie 2000 das Rohmaterial *Araldit DY-E* eingesetzt.⁸¹ Bei den Patchtests mit diesem Reaktivverdünner zeigte kein Patient eine Sensibilisierung der Haut. Im Vergleich der RP-HPLC-ELSD-Chromatogramme der vier Rohstoffe konnten keine Unterschiede weder im Peakmuster noch in der Intensität der einzelnen Peaks beobachtet werden. Alle detektierten Verbindungen sind Epichlorhydrinaddukte (Abb. 3.120). Eine Quantifizierung der einzelnen Derivate erfolgte nicht. Das Epoxidäquivalent wird von allen Herstellern mit einem Bereich von etwa 270 - 317 angegeben. Mit den eigenen Messungen konnten diese Angaben bestätigt werden (Kap. 5.4.5). Betrachtet man sich die molare Masse der reinen C12-AGE (242 g/mol), des einfachen Epichlorhydrinderivates C12-AGE·ECH (334 g/mol) und die ermittelten Werte, so ist davon auszugehen, dass die Rohstoffe zu einem gewissen Anteil aus reinen C12-AGE und C14-AGE bestehen, diese Verbindungen jedoch aufgrund zu geringer Response nicht detektiert werden konnten.

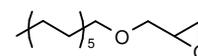


Abb. 3.119: C12-AGE

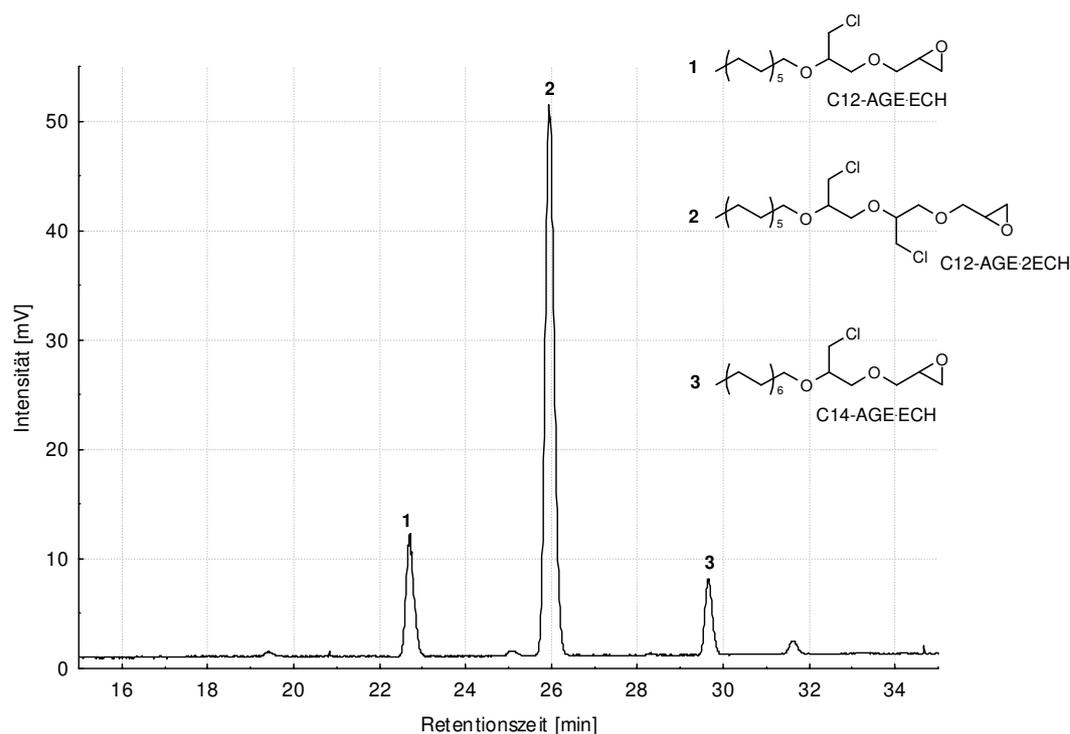


Abb. 3.120: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des C12/C14-AGE's *Araldit DY-E* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 70 % B, 30 min 100 % B, 35 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Phenylglycidylether (PGE)

Neben den genannten aliphatischen Reaktivverdünnern wurden in der umfangreichen dermatologischen Studie EPOX 2000 auch aromatische Reaktivverdünner getestet.⁸¹ Bezüglich des Phenylglycidylethers (Abb. 3.121) standen zwei Materialien, zum einen von *Aldrich* zum anderen

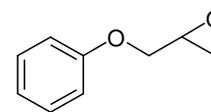


Abb. 3.121: PGE

der in der Studie verwendete Rohstoff von *Fluka*, zur Analyse zur Verfügung. Auf diese Studiensubstanz reagierten etwas mehr als 10 % der untersuchten Personen im Patschtest positiv.⁸¹

Die Identifizierung der im UV_{275nm} detektierten Verbindungen konnte nicht direkt mittels RP-HPLC /ESI-MSD erfolgen, da keine Ionisierung der Substanzen zu beobachten war. Erst nach Derivatisierung mit Dansylcysteamin, wobei die Peakzuordnung im Vergleich zur Detektion im UV (ohne Derivatisierung) über die Peakintensität erfolgte, konnte eine strukturelle Charakterisierung erfolgen. Im Chromatogramm des Studienmaterials wurde der reine PGE als Hauptverbindung bestimmt (Abb. 3.122).

Andere Substanzen konnten nicht identifiziert werden, wobei eingeschränkt durch die Identifizierung nach der Derivatisierung auch nur Derivate erfasst werden, die Epoxidgruppen enthalten. Für den PGE von *Fluka* wurde, bestimmt über das Peakflächenverhältnis im UV bei 275 nm, eine Reinheit von etwa 88 % (Herstellerangabe > 85 %) ermittelt. Für den zweiten PGE basierenden Reaktivverdünner von *Aldrich* konnte ebenso die Herstellerangabe der Reinheit von 99 % bestätigt werden.

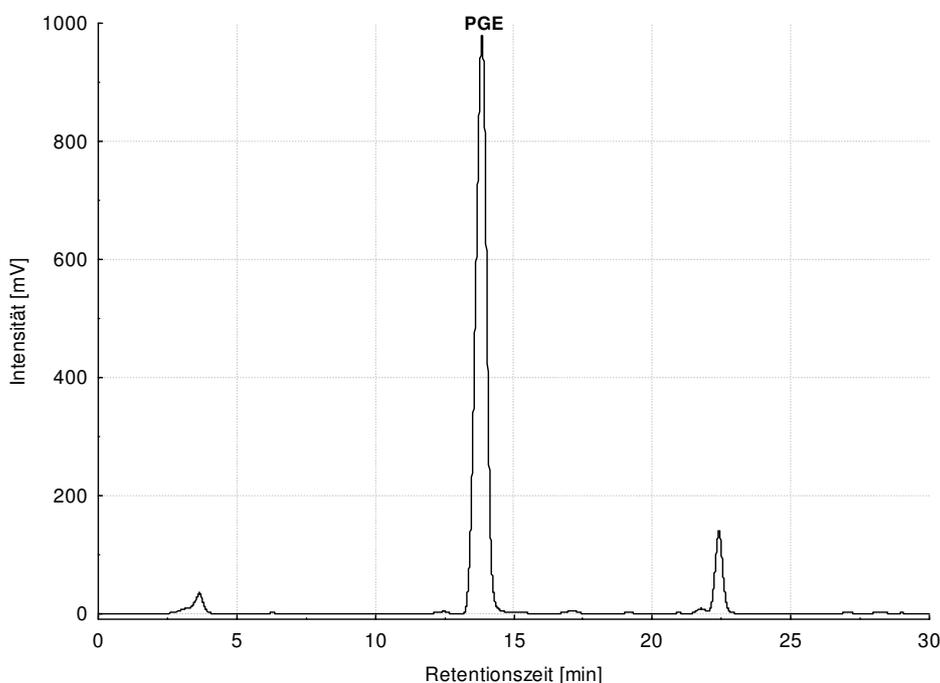


Abb. 3.122: RP-HPLC/UV_{275nm} - Chromatogramm des PGE's von Fluka; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Cresylglycidylether (CGE)

Bei dem zweiten aromatischen Reaktivverdünner CGE (Abb. 3.123) zeigten 6,8 % der Patienten eine allergische Reaktion im Patschtest.⁸¹

In gleicher Weise wie beim PGE standen beim CGE zwei Materialien zur vergleichenden Untersuchung zur Verfügung, die ebenfalls nur über die Derivatisierung mit Dansylcysteamin strukturell charakterisiert werden konnten. Sowohl in dem Material von *Aldrich* als auch in dem in der EPOX-Studie 2000 verwendeten Rohstoff *Grilonit RV 1805* konnte CGE als einzige epoxidgruppenhaltige Verbindung identifiziert werden, welche zudem in den UVD_{275nm}-Chromatogrammen die Hauptkomponente darstellt.⁸¹ In Abb. 3.124 ist das RP-HPLC/UVD-Chromatogramm des Studienmaterials *Grilonit RV 1805* dargestellt, welches sich nicht wesentlich vom zweiten CGE unterscheidet. Über das Peakflächenverhältnis konnte für den CGE von *Aldrich* eine Reinheit von etwa 88 % (Herstellerangabe 90 %) für den Rohstoff *Grilonit RV 1805* ein Gehalt von 82 % bestimmt werden.

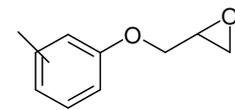


Abb. 3.123: CGE

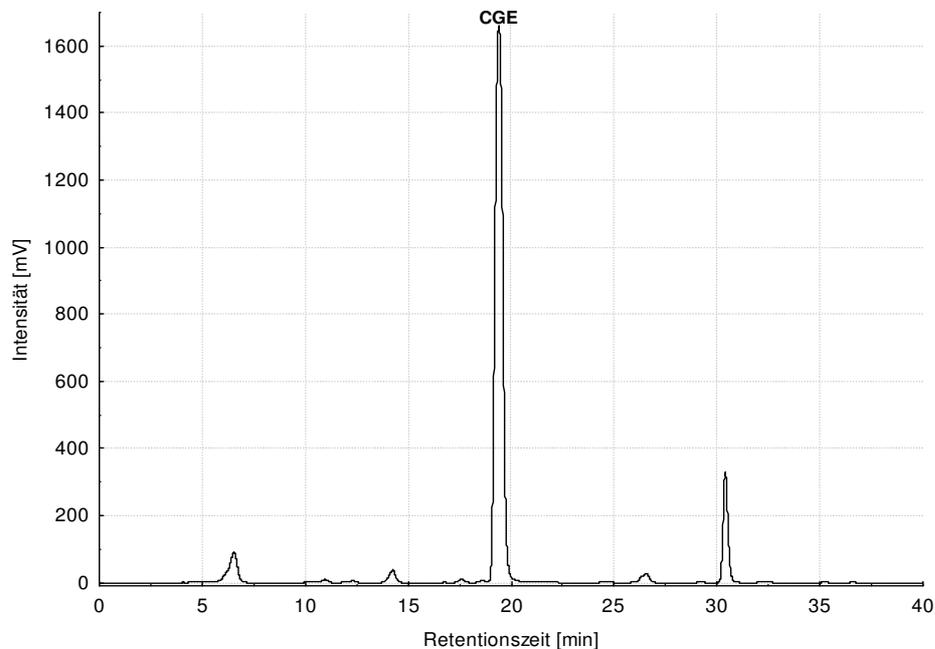


Abb. 3.124: RP-HPLC/UVD_{275nm} - Chromatogramm des CGE's *Grilonit RV 1805*; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

p-tert-Butylphenylglycidylether (PTBPGE)

Von dem ebenfalls aromatischen Reaktivverdünner PTBPGE (Abb. 3.125) lagen vier verschiedene Rohstoffe vor, wobei keines dieser Materialien identisch mit der Studiensubstanz in den Patchtests der Studie von Geier et al.⁸¹ war (11,5 % positiv getestete Patienten). Die Identifizierung der Verbindungen konnte ebenso wie bei den beiden letztgenannten Reaktivverdünnern, aufgrund der fehlenden Ionisierung im MSD, nur über die Derivatisierung mit

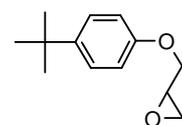


Abb. 3.125: PTBPGE

Dansylchlorid erfolgen. Der reine PTPBGE wurde dabei bei allen vier Rohstoffen als Hauptverbindung der Materialien bestimmt (Abb. 3.126).

Daneben konnte in drei von vier Produkten Cresylglycidylether in Konzentrationen von 1 - 5 % (UVD_{275nm}) ermittelt werden. Für einen weiteren Peak in den Chromatogrammen ergaben sich keine Strukturhinweise.

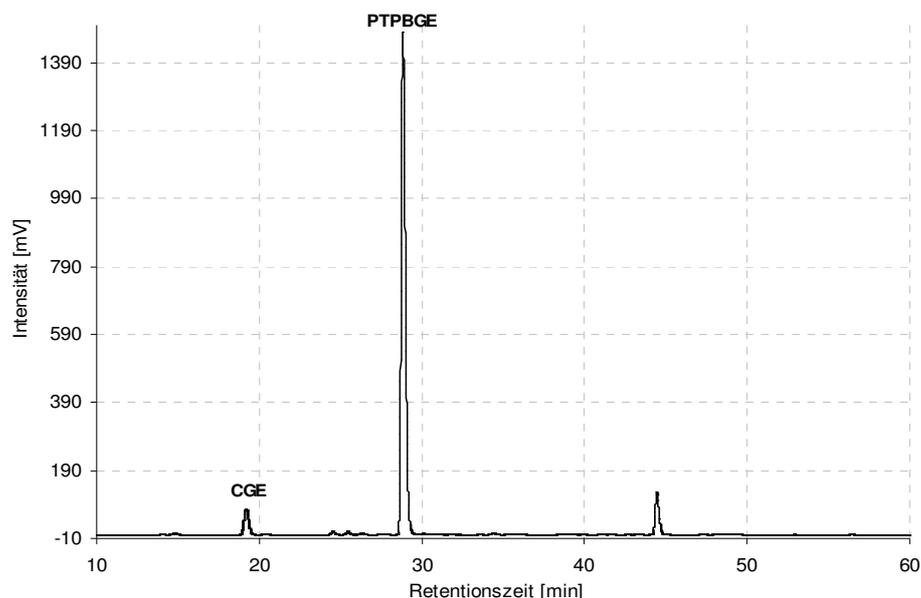


Abb. 3.126: RP-HPLC/UVD_{275nm} - Chromatogramm des PTPBGE's *Bakelite EPD AQ*; chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Butandioldiglycidylether (BDDGE)

Ebenfalls in der EPOX-Studie 2000 von Geier et al.⁸¹ wurde der Reaktivverdünner BDDGE getestet. Von den dabei untersuchten Probanden zeigten fast 20 % eine dermale Reaktion. Für die analytische Untersuchung lagen vier

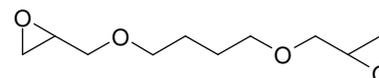


Abb. 3.127: BDDGE

Materialien unterschiedlicher Firmen vor, worunter sich jedoch nicht der in der Studie verwendete Rohstoff befand. Die bestimmten Epoxidäquivalente liegen alle in den von den Herstellern angegebenen Bereichen, die eine Spanne von 120 - 145 umfassen (Kap. 5.4.5).

Für alle vier Materialien wurde das, in Abb. 3.128 beispielhaft für den Rohstoff Erisys dargestellte Peakmuster erhalten.

Dabei stellt in diesen ELSD-Chromatogrammen das einfache Epichlorhydrinderivat die Hauptverbindung dar, wobei dieses Bild sehr wahrscheinlich aufgrund der hohen Flüchtigkeit des reinen BDDGE's trägt, was sich auch in ersten nicht bestätigten Quantifizierungsversuchen über die Derivatisierung mittels Dansylcysteamin andeutete.

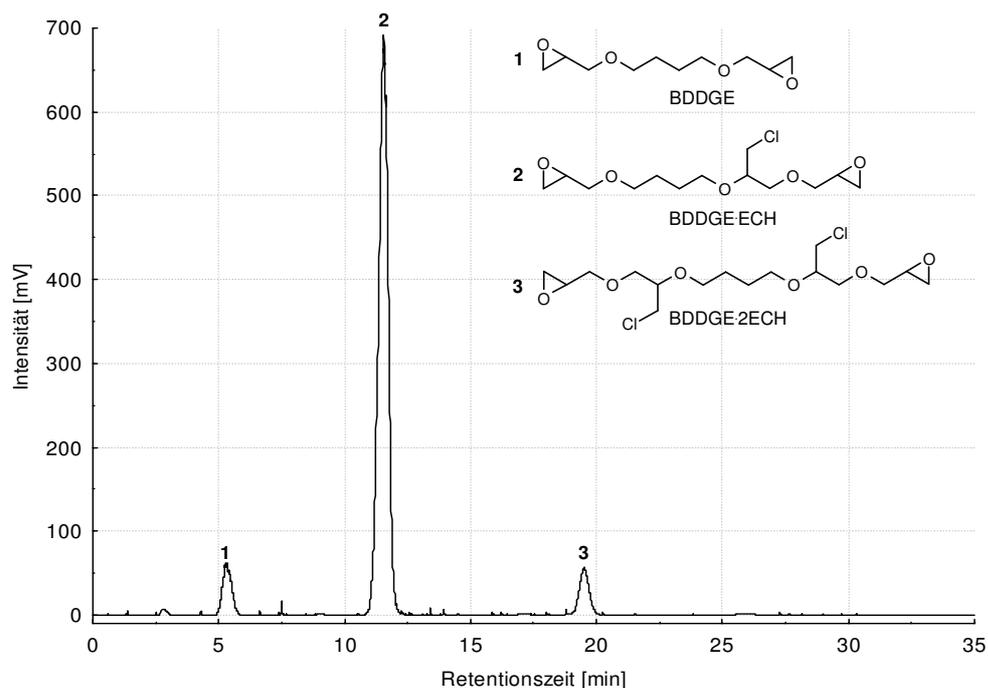


Abb. 3.128: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des BDDGE's *Erisys GE-21* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

3.3.4 Analyse weiterer Reaktivverdünner

Neben den in der dermatologischen Studie von Geier et al.⁸¹ eingesetzten Patchtestsubstanzen wurden weitere Reaktivverdünner auf Epoxidbasis zur Analytik herangezogen. Auch hier war die Zusammensetzung der Rohstoffe hinsichtlich einer dermatologischen Wirkung von Interesse. Auch bei diesen Untersuchungsmaterialien wurden mehrere Rohstoffe von unterschiedlichen Firmen analysiert, um evtl. Differenzen durch die Herstellung und somit in der Zusammensetzung zu erfassen.

2-Ethylhexylglycidylether (EHGE)

Von dem auf 2-Ethylhexanol basierenden Reaktivverdünner EHGE (Abb. 3.129) wurden drei Rohstoffe untersucht, die sich bezüglich des ELSD-Chromatogrammes in ihrem Peakmuster nicht unterschieden. Der reine 2-Ethylhexylglycidylether konnte dabei nicht detektiert werden. In

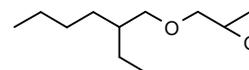


Abb. 3.129: EHGE

allen drei Untersuchungsmaterialien wurden das einfache und zweifache Epichlorhydrinaddukt nachgewiesen (Abb. 3.130). Ausgehend vom Peakflächenverhältnis im Chromatogramm liegen beide Verbindungen in allen Rohstoffen etwa in einem Verhältnis 3:1 vor. Eine Quantifizierung der Derivate erfolgte nicht. Bezüglich der Epoxidäquivalentmasse wurde bei allen Harzen ein Wert von etwa 208 bestimmt. Dies entspricht den Herstellerangaben, die bei Werten zwischen 205 - 235 liegen (Kap. 5.4.5). Analog zum C12/C14-AGE ist auch hier die molare Masse der einfachen Epichlorhydrinadduktes EHGE-ECH (278 g/mol) größer als das bestimmte Epoxidäquivalent. Es ist

somit auch bei diesen Rohstoffen anzunehmen, dass reiner EHGE (186 g/mol) Bestandteil des Materials ist, jedoch ebenfalls nicht detektiert werden konnte.

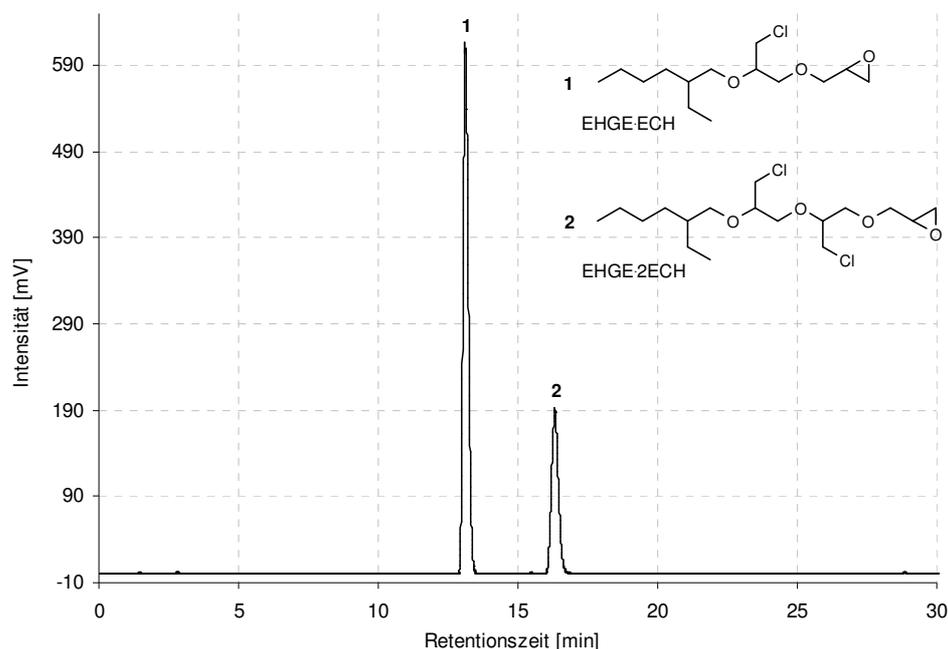


Abb. 3.130: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des EHGE's *Erisys GE-6* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 70 % B, 30 min 100 % B, 35 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

Neopentylglycoldiglycidylether (NPGDGE)

Bei diesem Reaktivverdünner standen zwei verschiedenen Rohstoffe zur Untersuchung zur Verfügung. Ebenso wie beim 2-Ethylhexanol basierenden Reaktivverdünner waren auch beim NPGDGE



Abb. 3.131: NPGDGE

(Abb. 3.131) zwischen beiden Materialien keine Unterschiede in den ELSD-Chromatogrammen feststellbar. Neben den einfachen und zweifachen Epichlorhydrinaddukten konnte auch bei diesem Reaktivverdünner der reine NPGDGE nicht detektiert werden (Abb. 3.132). Für den im Chromatogramm dargestellten Rohstoff wurde ein Epoxidäquivalent von 139 bestimmt, der Wert liegt damit knapp über der Herstellerangabe von 125 - 137 (Kap. 5.4.5).

Dem Peakflächenverhältnis in den Chromatogrammen zufolge, werden die Rohstoffe durch ein Verhältnis der beiden Derivate von etwa 7 : 1 charakterisiert. Eine Quantifizierung über die Derivatisierung mit Dansylcysteamin erfolgte nicht.

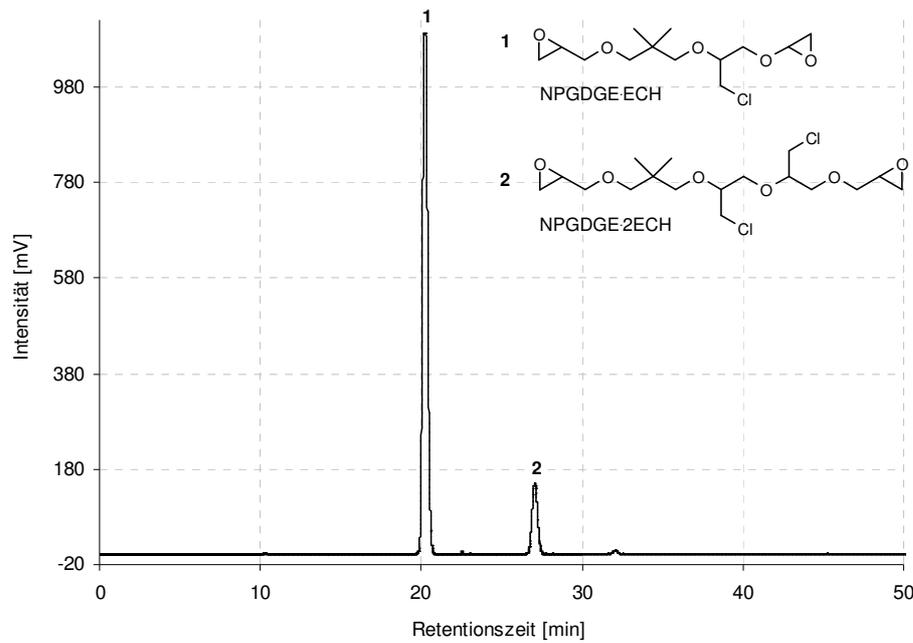


Abb. 3.132: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des NPGDGE's *Erisys GE-20* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

C13/C15-Alkylglycidylether (C13/C15-AGE)

Analog zu dem um eine Methylengruppe differierenden Reaktivverdünner C12/C14-AGE wurden auch in den zwei untersuchten Rohstoffen des C13/C15-AGE (Abb. 3.133) nur Epichlorhydrinaddukte identifiziert.

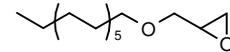


Abb. 3.133: C13-AGE

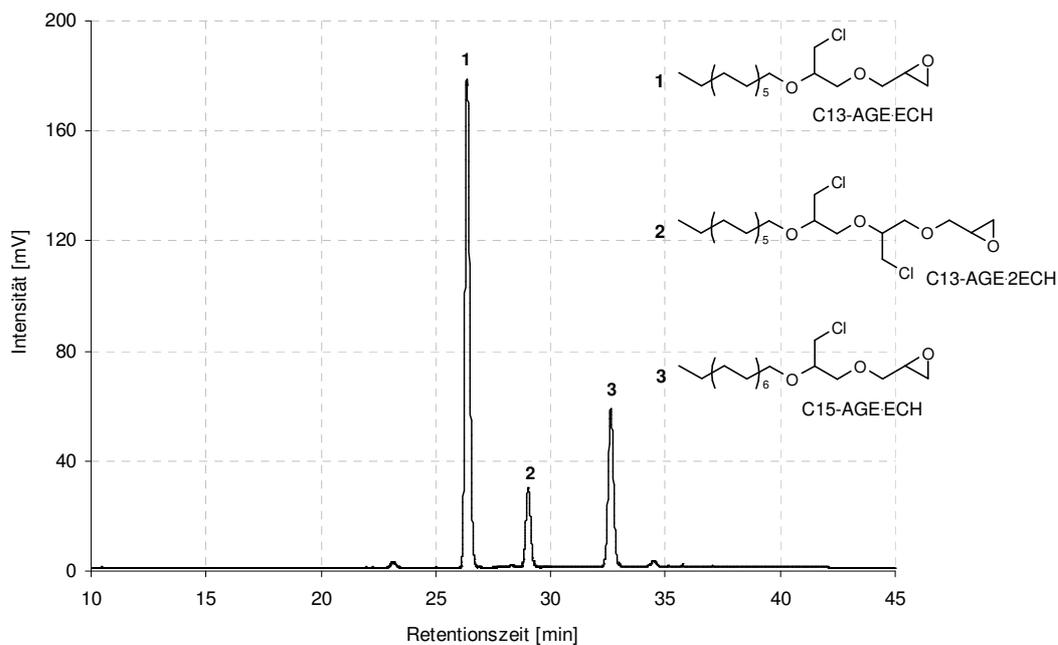


Abb. 3.134: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des C13/C15-AGE's *Grinolit RV 1814* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 70 % B, 30 min 100 % B, 35 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

In Abb. 3.134 ist beispielhaft das RP-HPLC/ELSD-Chromatogramm des Rohstoffes *Grinolit RV 1814* dargestellt. Abgesehen von geringen Schwankungen in den prozentualen Anteilen der einzelnen Komponenten (ELSD-Chromatogramme) konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Rohmaterialien beobachtet werden.

Das Epoxidäquivalent liegt bei beiden Rohstoffen etwas über 290, womit wiederum die Herstellerangaben bestätigt werden konnten (Kap. 5.4.5). In gleicher Weise wie beim C12/C14-AGE ist auch bei diesem Rohstoff, aufgrund der molaren Massen der identifizierten Verbindungen, ein Anteil an reinem C13/C15-AGE zu vermuten.

Polypropylenglycoldiglycidylether (PPGDGE)

Von dem polymeren Reaktivverdünner PPGDGE (Abb. 3.135) wurden drei verschiedene Produkte untersucht, wobei z. T. deutliche Unterschiede zu beobachteten waren. Im Rohstoff *Erisys GE-23*

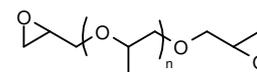


Abb. 3.135: PPGDGE

konnten ähnlich wie in den bereits beschriebenen Reaktivverdünnern deutlich zwei Derivate als Hauptverbindungen identifiziert werden (Abb. 3.136). Wobei es sich dabei ebenso nicht um reine Glycidylether, sondern um die Epichlorhydrinaddukte dieser handelt. Im Gegensatz dazu wiesen die beiden verbleibenden Rohmaterialien, in Abb. 3.136 beispielhaft für den Rohstoff *Grilonit F 704* dargestellt, ein deutlich anderes Peakmuster auf. Hierbei zeigte sich zum einen eine Polymerverteilung um die reinen Glycidylether mit einer Kettenlänge von $n = 4$ bis $n = 10$ und zum anderen die Verteilung um deren korrespondierende einfache Epichlorhydrinaddukte bei gleicher Anzahl an Monomereinheiten.

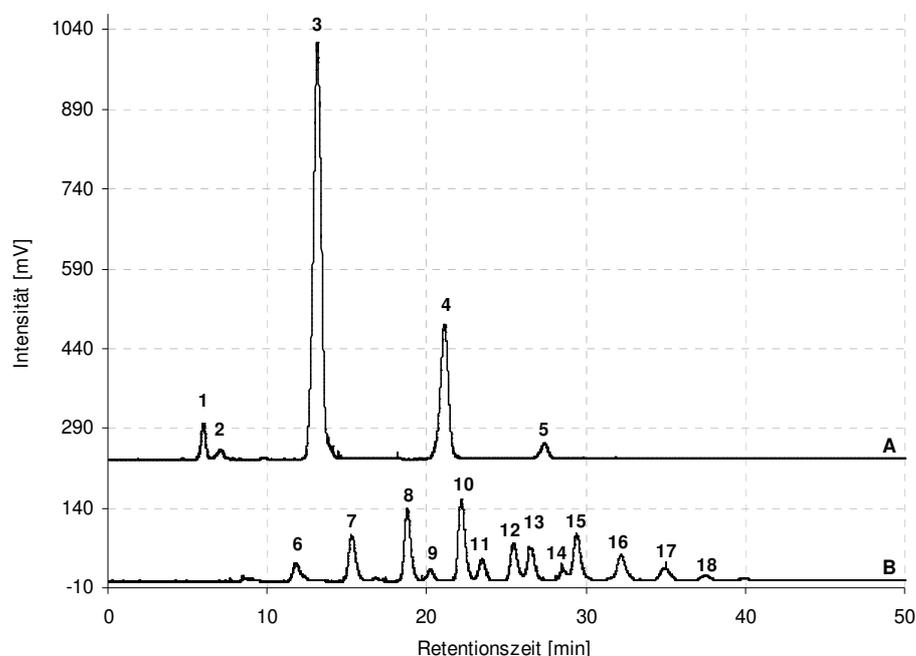


Abb. 3.136: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramme der PPGDGE *Grilonit F 704* (B) und *Erisys GE-23* (A) dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

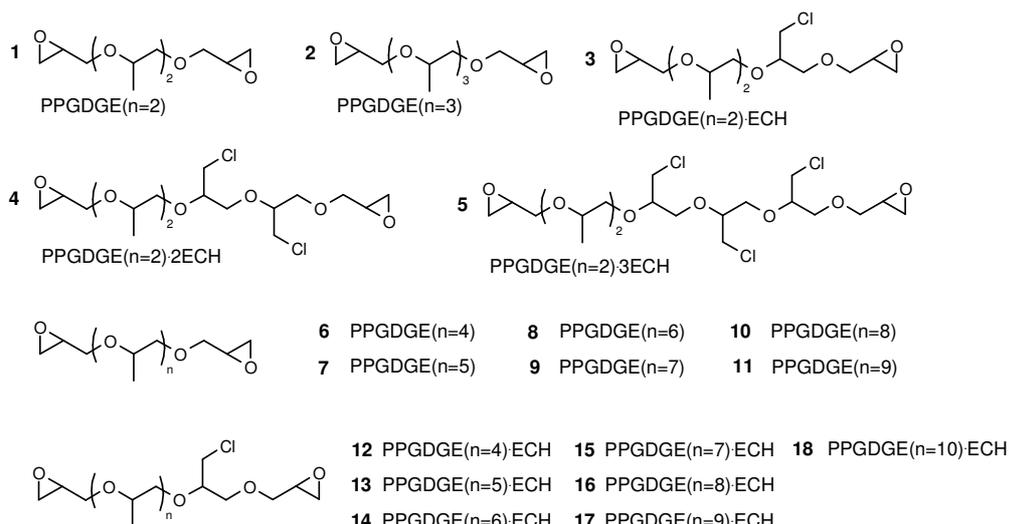


Abb. 3.137: Strukturvorschläge für die im Chromatogramm Abb. 3.136 markierten Peaks

Niedermolekulare Verbindungen unter einer Anzahl an Monomeren von $n = 4$, wie im Material *Erisys GE-23* konnten in diesen Rohstoffen nicht detektiert werden.

Eine Quantifizierung der einzelnen Derivate über die Derivatisierung mittels Dansylcysteamin erfolgte nicht.

Die Unterschiede der Rohstoffe werden auch in den bestimmten Epoxidäquivalenten sichtbar. Für die Materialien Grinolit F 704 und Polyox 19 wurden Werte von 315 bzw. 309 ermittelt. Im Gegensatz dazu lag das Epoxidäquivalent von *Erisys GE-23* mit 173 deutlich niedriger (Kap. 5.4.5).

Cyclohexandimethanoldiglycidylether (CHDMDGE)

Bei der Untersuchung dieses cycloaliphatischen Glycidylethers (Abb. 3.138), von dem nur ein Rohstoff zur Verfügung stand, gelang die Identifizierung der enthaltenen Verbindungen in geringerem Umfang als bei den bisher diskutierten Reaktivverdünnern.

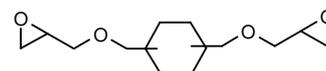


Abb. 3.138: CHDMDGE

Entsprechend dem Peakflächenverhältnis im ELSD-Chromatogramm konnten zwei der drei Hauptverbindungen strukturell nicht charakterisiert werden (Abb. 3.139). Die für diese Verbindungen mittels RP-HPLC/ESI-MSD bestimmten Massen waren keinen Substanzen, die aus einer bekannten, bei der Herstellung von Epoxidverbindungen ablaufenden Reaktion auf Basis des CHDMDGE's entstehen könnten, zuzuordnen. Die Epoxidäquivalentmasse wurde zu 176 bestimmt und liegt somit in der vom Hersteller angegebenen Spanne von 167 – 179 (Kap. 5.4.5).

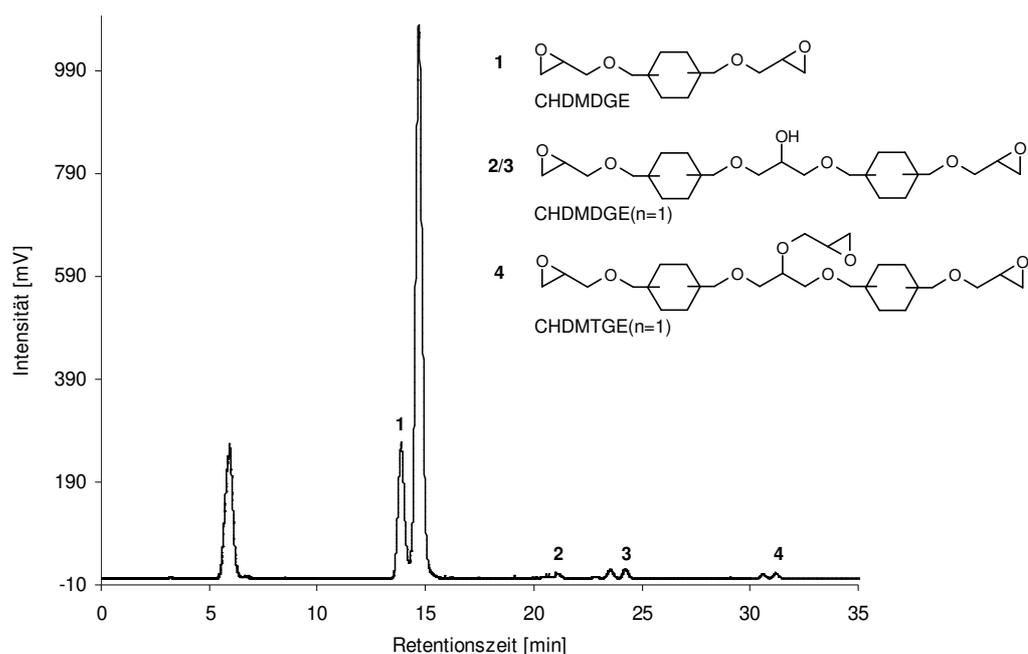


Abb. 3.139: RP-HPLC/ELSD - Chromatogramm des CHDMDGE's *Araldit DY-C* und dessen identifizierte Verbindungen; chromatographische Bedingungen: A: NH_4 -formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 35 % B, 45 min 95 % B, 50 min 95 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5 μ , 250 x 3 mm

3.3.5 Analytik von Handelsprodukten

Neben den, in verschiedensten Baumaterialien eingesetzten Rohstoffen sollten kommerziell erhältliche, auch für den privaten Haushalt bestimmte Handelsprodukte bezüglich ihrer Zusammensetzung analysiert werden. Dafür ausgewählt wurden vier Produkte, die entsprechend ihren Inhaltsstofflisten Reaktivverdünner und Harze mit bekanntem allergenen Potential, enthielten.

2-Komponentenkleber

Von diesem Handelsprodukt wurde nur die Harzkomponente analysiert. Als Reaktivverdünner zur Härtung des Harzes stand laut Inhaltsstoffangabe ein Polyamin zur Verfügung. Die Epoxidkomponente bestand entsprechend der Kennzeichnung aus einer Mischung von Bisphenol A- und Bisphenol F-Epichlorhydrin-Epoxidharzen. Im Chromatogramm des Harzes konnten jedoch nur Verbindungen des BPA-Harzes detektiert werden (Abb. 3.140).

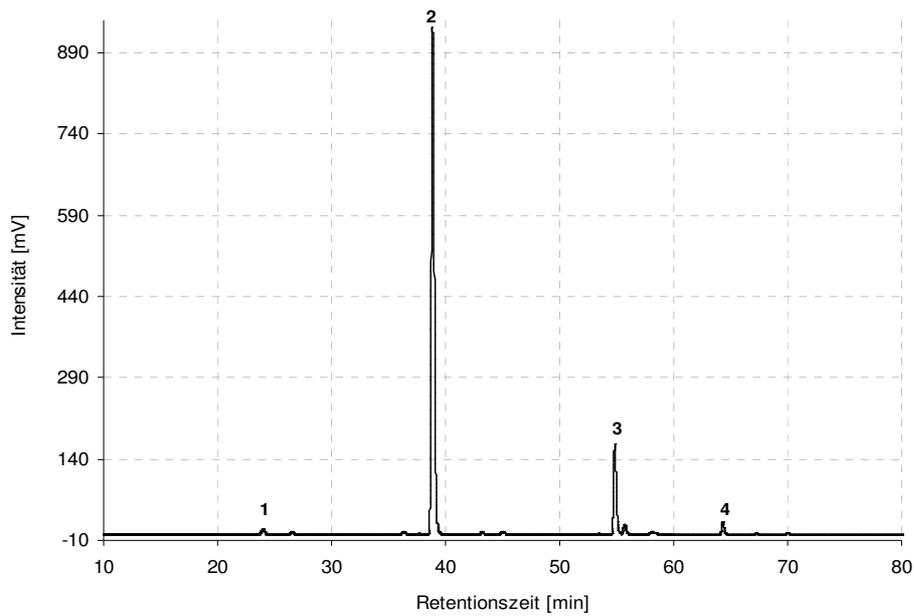


Abb. 3.140: RP-HPLC/UV_{D275nm} - Chromatogramm der Harzkomponente des Zweikomponentenklebers; 1...BADGE·H₂O, 2...BADGE, 3...BADGE(n=1), BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 30 % B, 70 min 100 % B, 80 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Fließfähiges Epoxidharz (Gießharz)

Dieses vorwiegend für den privaten Haushalt (Modellbau) bestimmte Produkt bestand laut Inhaltstoffangaben hauptsächlich aus einem BPA basierendem Epoxidharz (> 50 %). Daneben waren BPF-Harz (< 25 %) sowie der Reaktivverdünner HDDGE (< 25 %) gekennzeichnet.

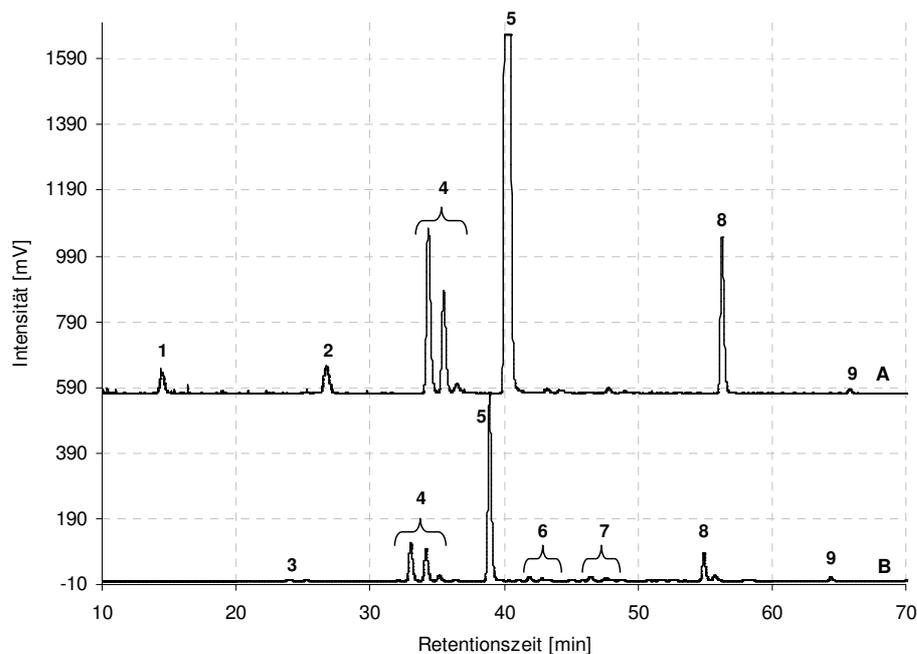


Abb. 3.141: RP-HPLC/UV_{D275nm} (B) und -ELSD (A)-Chromatogramme des fließfähigen Gießharzes; 1...HDDGE, 2...HDDGE·ECH, 3...BADGE·H₂O, 4...BFGDE, 5...BADGE, 6...3-Ring-NOGE, 7...BFDGE, 8...BADGE(n=1), 9...BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 30 % B, 70 min 100 % B, 80 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Im Vergleich der Chromatogramme der einzelnen Rohmaterialien mit den UVD_{275nm} - bzw. ELSD - Chromatogrammen des Gießharzes konnten viele Verbindungen identifiziert werden (Abb. 3.141). Bei den für dieses Produkt verwendeten aromatischen Epoxidharzen konnten ebenso wie bei den Studienmaterialien die monomeren Verbindungen BADGE und BFDGE über das Peakflächenverhältnis jeweils als Hauptverbindungen bestimmt werden. Auch der reine HDDGE's und dessen einfaches Epichlorhydrinaddukt konnte identifiziert werden. Die Zusammensetzung des Produktes bestätigte sich somit bezüglich der einzelnen Komponenten.

Wärmeleitfähiges Epoxidharz (Gießharz)

Auch das dritte untersuchte kommerzielle Handelsprodukt findet vorwiegend Verwendung im Modellbau und somit in privaten Haushalten, wobei die Basis ein Füllmaterial, in diesem Fall Aluminiumoxid, ist. Aufgrund dessen ist der Gehalt der Epoxidkomponenten im Gegensatz zu den anderen Produkten wesentlich geringer. Als Basisharz wird im Inhaltstoffverzeichnis BPA-Harz aufgeführt (10 - 30 %). Jedoch auch bei diesem Produkt ist ein geringer Anteil von BPF-Harz enthalten (1 - 5 %). Beide Komponenten konnten im UVD_{275nm} - Chromatogramm nachgewiesen werden (Abb. 3.143). Von den zwei gekennzeichneten Reaktivverdünnern PTBGE (1 - 5 %) und BDDGE (1 - 10 %) wurde dagegen nur die aliphatische Komponente detektiert.

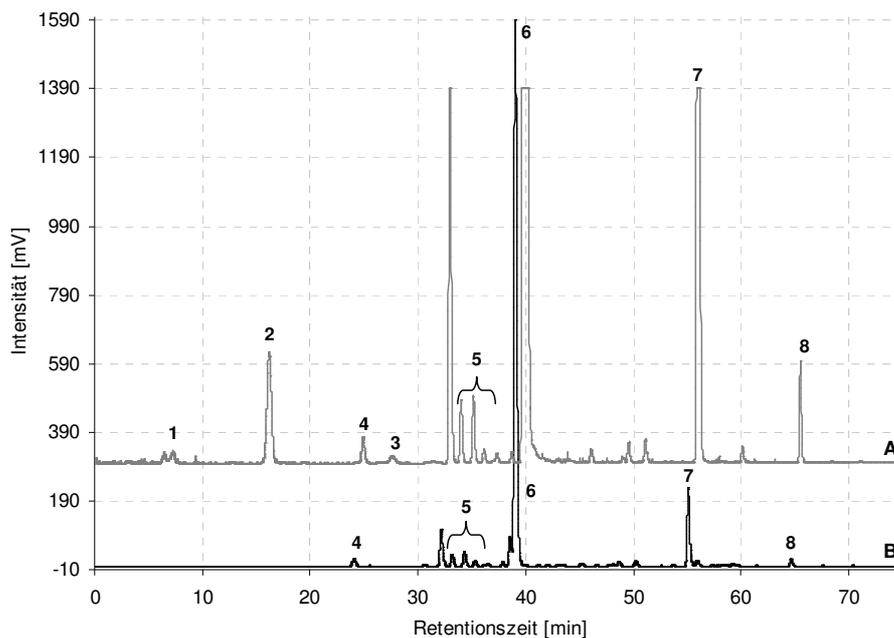


Abb. 3.142: RP-HPLC/UVD_{275nm} (B) und -ELSD (A) -Chromatogramme des wärmeleitfähigen Gießharzes; 1...BDDGE, 2...BDDGE·ECH, 3...BDDGE·2ECH, 4...BADGE·H₂O, 5...BFDGE, 6...BADGE, 7...BADGE(n=1), 8...BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 30 % B, 70 min 100 % B, 80 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Spachtelmasse

Das vierte untersuchte Produkt, eine Spachtelmasse aus dem Baugewerbe besteht ebenfalls aus vier Epoxidkomponenten. Basis dieses als Beschichtungsmittel eingesetzten Produktes sind Sandzuschläge.

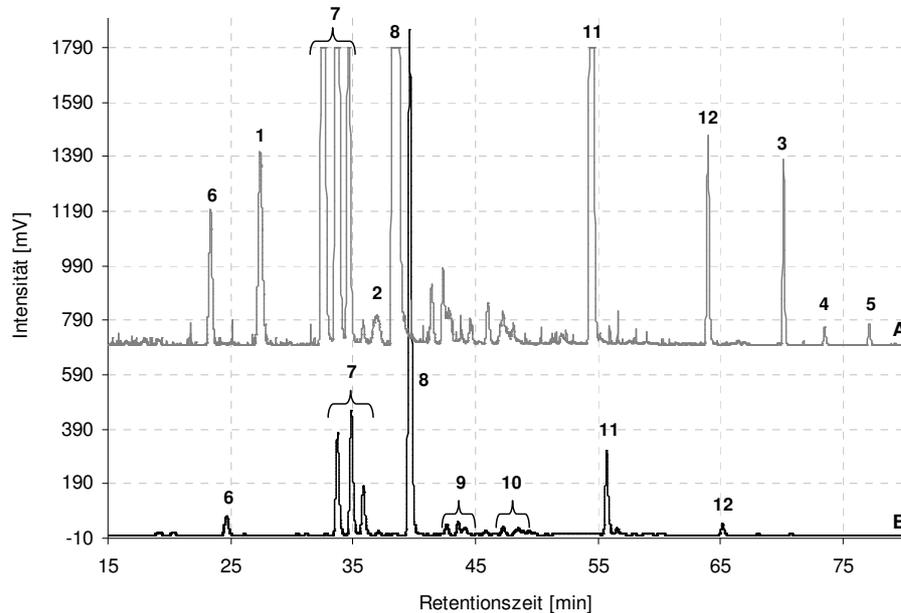


Abb. 3.143: RP-HPLC/UV_{275nm} (B) und -ELSD (A)-Chromatogramme der Spachtelmasse; 1...NPGDGE, 2...NPGDGE·ECH, 3...C13-AGE·ECH, 4...C13-AGE·2ECH, 5...C15-AGE·ECH, 6...BADGE·H₂O, 7...BFDGE, 8...BADGE, 9...3-Ring NOGE, 10...BFDGE(n=1), 11...BADGE(n=1), 12...BADGE(n=2); chromatographische Bedingungen: A: NH₄-formiat 50 mM pH 3, B: MeCN, 0 min 30 % B, 70 min 100 % B, 80 min 100 % B; 0,5 ml/min bei 25 °C, RP-18, 5µ, 250 x 3 mm

Auch bei diesem Produkt ist die Epoxidharzkomponente eine Mischung aus BPA und BPF basierendem Harz (beide 2,5 - 10 %). Als Reaktivverdünner wurden in geringem Prozentsatz (< 2,5 %) C13/C15-AGE und NPGDGE eingesetzt. Alle vier Komponenten konnten im Produkt nachgewiesen werden (Abb. 3.142).

3.3.6 Diskussion der Ergebnisse zur Analyse von Epoxiden mit dermalen Kontakt

Beim Vergleich der Zusammensetzung der einzelnen Studiensubstanzen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den aromatischen und aliphatischen Rohstoffen. Während die BPA und BPF basierenden Harze überwiegend über die Monomere BADGE und BFDGE charakterisiert werden, sind bei einigen Reaktivverdünnern die reinen Glycidylether gar nicht oder nur in geringen prozentualen Anteilen enthalten. Diese Ergebnisse sind jedoch, im Zusammenhang mit den Erkenntnissen zu den Synthesemechanismen dieser Epoxidmaterialien nicht überraschend. So wird durch die sauer geführte Reaktion bei den aliphatischen Verbindungen die Bildung von 1,3-Chlorhydrinen, als Nebenreaktion zur 1,2-Chlorhydrinbildung gefördert.⁹ Dieser nicht hydrolysierbare Chloranteil verbleibt im Molekül, so dass im weiteren Verlauf der Darstellung Epichlorhydrinaddukte entstehen. Im Vergleich zu den Harzen liegen somit in den Reaktivverdünnern variierende prozentuale Anteile an verschiedenen Epichlorhydrinaddukten vor.

Die für die Epikutantests eingesetzten Studiensubstanzen sind demzufolge sehr inhomogen, wodurch ein allergenes Potential möglicherweise nicht nur einer Verbindung zugeschrieben werden kann. So konnte Basketter et al.⁷⁶ zeigen, dass die chlorierten Derivate, ebenso wie die Epoxide, in der Lage sind über einen S_N2-Mechanismus mit Proteinen zu reagieren. Daneben kann es sich bei den Produkten auch um Mischungen verschiedener basierender Epoxide handeln, die als solches nicht deklariert sind. So konnte in dem als HDDGE (*Araldit DY-H*) bezeichneten Material auch ein deutlicher Anteil an BPA-Harz nachgewiesen werden. Das es sich, bei dem in der Studie eingesetzten Reaktivverdünner *Araldit DY-H* um das identische Untersuchungsmaterial handelt, ist jedoch fraglich. So reagierten im Patchtest 55,2 % der Patienten auf das BPA – Harz allergisch, auf den aliphatischen Reaktivverdünner HDDGE jedoch nur 19,5 %. Bei einer Verunreinigung des Untersuchungsmaterials wäre somit bei einer größeren Anzahl an Patienten eine Sensibilität zu erwarten gewesen. Ebenso konnte im Reaktivverdünner PTBPGE, wenn auch nur in geringen Mengen, eine weitere epoxidische Verbindung (CGE) nachgewiesen werden.

Neben den vorliegenden Untersuchungen des BPA-Harzes, analysierten ebenfalls Ponten et al.¹³² dieses von Hermal im Patchtest eingesetzte Harz. Wobei jedoch nur der Monomergehalt des isomeren BFDGE und BADGE bestimmt wurde. Der über das Peakflächenverhältnis bestimmte Gehalt an BADGE von rund 85 % sind den mit von Ponten et al.¹³² ermittelten ca. 81 % vergleichbar. Die Isomeren des BFDGE's wurden von Ponten et al.¹³² nur in Spuren (< 0,2 %) bestimmt.

Im Vergleich der einzelnen Rohstoffe von unterschiedlichen Firmen konnte in den meisten Fällen keine Unterschiede beobachtet werden, so dass bei entsprechend eingesetzten Patchtestsubstanzen eine gute Übereinstimmung zu dem im Handel verfügbaren Materialien besteht. Nur beim polymeren Reaktivverdünner PPGDGE sind wesentliche Differenzen zwischen den Rohmaterialien, die sehr wahrscheinlich auf den Polymerisationsvorgang zurückzuführen sind, zu beobachten.

Beim Vergleich der Zusammensetzung der Handelsprodukte mit denen der einzelnen Rohstoffe konnten kaum Unterschiede festgestellt werden. Bei allen Produkten ist ein BPA-Harz die basierende Epoxidkomponente, welches sich in seinem Aufbau nur unwesentlich von dem analysierten Rohstoff, bei welchem es sich um die Substanz der Standardtestreihe „Epoxidharz“ handelt, unterscheidet. Das in den Patchtests verwendete BPA-Harz spiegelt somit bezüglich der untersuchten Handelsprodukte in seiner Zusammensetzung gut die Produkte wieder, mit denen die Patienten in Kontakt kommen. Bei den von Ponten et al.¹³² untersuchten Klebstoffen war das BPA-Harz ebenfalls stets Hauptkomponente, wobei der Anteil des Monomers BADGE zu 60 - 90 % bestimmt wurde.

Auch bei den, in den Handelsprodukten verwendeten BPF basierenden Harzen und den detektierten Reaktivverdünnern konnten ebenfalls kaum Unterschiede zu den untersuchten Rohstoffen beobachtet werden. Bei diesen Reaktivverdünnern sind analog zu den untersuchten Einzelsubstanzen ebenfalls Epichlorhydrinaddukte enthalten.

4 Zusammenfassung

Ein Großteil der Lebensmittel wird in der heutigen Zeit vor allem aufgrund ihrer langen Haltbarkeit in Konservendosen verpackt. Zur Qualitätserhaltung des Lebensmittels werden Weißblechdosen im Innenbereich in der Regel mit einer Lackierung versehen. Lackrohstoffe sind dabei u. a. Phenol- und Epoxidharze, die als Basis- oder Vernetzkomponente eingesetzt werden. Bei der Herstellung und Lagerung dieser Lebensmittel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es zur Migration von Bestandteilen aus der Kunststoffinnenbeschichtung in das Füllgut kommt. Toxikologisch und somit auch analytisch sind dabei vor allem die migrierenden Verbindungen unter 1000 Da von Interesse, da Substanzen mit einer Molmasse von über 1000 Da nur zu weniger als 1 % im Gastrointestinaltrakt absorbiert werden.

Analytik von phenolischen Verbindungen

Bei Untersuchungen zur Migration phenolischer Verbindungen unter Verwendung verschiedener Modellcoatings und Simulanzlösemittel wurden Konzentrationen an migrierenden phenolischen Substanzen in Summe bis 160 µg/dm² bestimmt, womit dieser Gehalt deutlich unter dem gesetzlichen Grenzwert für die Gesamtmigration von 10 mg/dm² liegt. Die Quantifizierung erfolgte dabei über SEC-FLD-Kalibriergeraden der für diese Coatings verwendeten Phenolharze. Tendenziell steigt dabei die Menge an übergehenden Verbindungen mit abnehmender Polarität der verwendeten Simulanzien. Ebenso abhängig vom Lösungsmittel ist die Molekulargewichtsverteilung der im Migrat enthaltenen Phenole. So zeigte sich eine deutliche Verschiebung der phenolischen Verbindungen zu höheren Molekulargewichten mit abnehmender Polarität der Simulanzlösemittel. Mit wenigen Ausnahmen besitzen jedoch alle migrierenden Substanzen eine Molmasse von unter 1000 Da. Das beobachtete Migrationsverhalten kann u. a. auf die unterschiedliche Reaktivität der phenolischen Basismonomere der Harze zurückgeführt werden, wodurch die Fähigkeit variiert, unter den Einbrennbedingungen ein ausgeprägtes Netzwerk zu bilden.

Zur näheren Charakterisierung der Phenolharze wurden einzelne Hauptverbindungen der RP-HPLC-FLD-Chromatogramme identifiziert. Über Derivatisierungsreaktionen mit Picolinsäure, Essigsäureanhydrid sowie Dansylchlorid konnten Informationen zur Anzahl an alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen im Molekül erhalten werden. Mit dem Wissen um die eingesetzten Phenolmonomere und einer eventuellen Veretherung konnten Strukturvorschläge erstellt werden.

Die Quantifizierung der migrierenden phenolischen Verbindungen in Migraten kommerzieller Coatings in Summe wurde über eine universell anwendbare Kalibrierung angestrebt. Dazu wurden 17 verschiedene Phenolharze bezüglich der Steigung der SEC-FLD-Kalibriergeraden, des mittleren Molekulargewichtes, der Hydroxylzahl und dem Verhältnis OH-Gruppen/Molekül charakterisiert. Wie erwartet steigt mit wenigen Ausnahmen die Anzahl der OH-Gruppen im Molekül tendenziell mit dem mittleren Molekulargewicht. Es zeigte sich zudem, dass die verschiedenen Phenolharze in ihren fluorophoren Eigenschaften stark variieren. Die Steigung der SEC-FLD-Kalibriergeraden konnte zudem in keine Korrelation mit einem anderen ermittelten Parameter gebracht werden. Die

Anwendung einer universellen Kalibriergerade zur Quantifizierung war deshalb nicht möglich. Die Größenordnungen der Migratkonzentrationen konnten daher nur über die zwei im Anstieg am stärksten variierenden SEC-FLD-Kalibriergeraden abgeschätzt werden.

Bei der Analyse kommerzieller Epoxy-Phenol-Coatings war im Gegensatz zu Polyester-Phenol-Coatings die isolierte Detektion der phenolischen Verbindungen im Migrat mittels Fluoreszenz nicht möglich, da sowohl Epoxide als auch Phenole fluorophorer Eigenschaft besitzen. Es wurde daher eine Methode zur Abtrennung der Phenole von anderen im Migrat enthaltenen Substanzen auf Basis eines Anionenaustauschermaterials entwickelt. Dabei wurde die Eigenschaft der Phenole genutzt, im basischen Milieu Phenolate zu bilden. Diese, aber auch Säuren adsorbieren am Austauschermaterial, während Epoxide oder Polyester nicht retardiert werden. Für zwei kommerzielle Epoxy-Phenol-Coatings konnte somit der Anteil an phenolischen Verbindungen im Migrat zu 7 und 28 % bestimmt werden. Mittels RP-HPLC/ESI-MS war es möglich, einige der phenolischen Verbindungen in diesen Migraten zu identifizieren. Dabei handelt es sich um nichtepoxidierte BPA-Derivate der Epoxidkomponente des Coatings, die aufgrund des BPA-Grundkörpers eine phenolische Hydroxylgruppe besitzen. Phenolische Vernetzungsprodukte beider Basisharze konnten dagegen nicht identifiziert werden. Die Menge an migrierenden phenolischen Verbindungen der beiden Epoxy-Phenol-Coatings konnte über die Kalibration eines niedermolekularen Epoxidharzes zu 0,1 mg/dm² bzw. 0,27 mg/dm² abgeschätzt werden.

Während für einzelne phenolische Verbindungen gesetzliche Grenzwerte für die Migration bestehen, gibt es für Oligomere, mit Ausnahme von BPA keine spezifischen Migrationslimits. Ebenso sind in der Literatur kaum toxikologische Untersuchungen zu Phenololigomeren zu finden. Um einen ersten Einblick in die toxikologische Relevanz migrierender phenolischer Verbindungen zu erhalten, wurden mehrere kommerzielle als auch selbst synthetisierte phenolische Standardsubstanzen und verschiedene Molekulargewichtsfractionen eines Phenolharzes, im Fischembryotest an Eiern des Zebraäbrlings (*Brachydanio rerio*) nach DIN 38415-T6⁴⁷ und/oder Neutralrottest an Hep-G2 und HT-29 Zellen untersucht. Die stärksten Effekte im Fischembryotest bewirkte das Trimer BPM, hier reichte bereits eine Konzentration von etwa 2 mg/l aus, um 50 % der Fischembryonen letal zu schädigen. Im Gegensatz dazu waren beim Dimer 5-Hydroxymethyl-2,4'-dihydroxydiphenylmethan (M 230) mit einem EC₅₀-Wert von 170 mg/l die geringste toxikologische Wirkung zu beobachten. Für alle anderen Substanzen konnten EC₅₀-Werte im Bereich 20 - 100 mg/l bestimmt werden. Tendenziell zeichnete sich dabei eine Zunahme der EC₅₀-Werte mit steigender Lipophilie, ausgedrückt über den K_{OW}-Wert ab, was auf den Aufbau der Fischeier zurückzuführen ist. So müssen die zu untersuchenden Xenobiotika mehrere lipophile Membranen durchdringen, um am eigentlichen Wirkungsort Einfluss auf die Embryonalentwicklung nehmen zu können.

Im Zelltest konnten tendenziell ähnliche Ergebnisse ermittelt werden wie im Fischembryotest, wobei in der Regel die Hep-G2 Zellen empfindlicher reagieren als die HT-29 Zellen. Während für Phenol im untersuchten Konzentrationsbereich keine toxischen Effekte beobachtet werden konnten, liegen die EC₅₀-Werte für das Trimer BPM, analog zum Fischembryotest deutlich unter 10 mg/l. Für die anderen Verbindungen wurden EC₅₀-Werte zwischen 16 und 100 mg/l bestimmt.

Analog zu den Untersuchungen der Einzelsubstanzen zeigte sich auch bei den 5 untersuchten Molekulargewichtsfractionen zwischen 0 und 1000 Da, dass das toxikologische Potential im niedermolekularen Bereich (0 - 200 Da) gegenüber den Fraktionen 200 - 400 und 400 - 600 Da vergleichsweise gering ist. Bereits 25,1 mg/l bzw. 17,3 mg/l der Fraktionen 200 - 400 Da und 400 - 600 Da waren in den Tests ausreichend, um alle Embryonen letal zu schädigen. Im Molekulargewichtsbereich über 600 Da konnten dagegen lediglich subletale oder gar keine Missbildungen beobachtet werden.

Analytik von Epoxiden

In der amtlichen Überwachung beschränkt sich die Analytik von Epoxidverbindungen bisher auf die Bestimmung rechtlich geregelter Einzelsubstanzen. Eine Summenmethode zur Erfassung aller in einem Migrat enthaltenen Substanzen mit reaktionsfähigen Oxirangruppen, wodurch das gesamte Reaktionspotential erfasst werden kann, liegt dagegen nicht vor.

Zur selektiven Erfassung aller oxirangruppenhaltigen Verbindungen wurde daher mittels statistischer Versuchsplanung eine Derivatisierung mittels Cysteamin entwickelt. Die Reaktion mit Cysteamin erfolgt dabei nach Abtrennung der Substanzen > 1000 Da mittels Größenausschlusschromatographie. Im Anschluss werden die Derivate durch Zugabe eines Kationenaustauschers aus der Lösung entfernt. Durch den Vergleich der RP-HPLC-FLD Chromatogramme vor und nach der Aufarbeitung können Substanzen mit intakten Oxirangruppen somit einfach erkannt werden. Eine quantitative Abschätzung der enthaltenen Epoxidverbindungen ist bei Lacken auf Basis von BPA-Harzen über die BPA-Chromophorkonzentration möglich. Bei der Untersuchung von 5 kommerziellen Coatings wurden in den einzelnen Migraten recht unterschiedliche Gehalte an Substanzen mit intakten Epoxidgruppen ermittelt. Ebenso ist die Anzahl der oxirangruppenhaltigen Verbindungen, auf die sich dieser Gehalt verteilt sehr unterschiedlich, was möglicherweise an unterschiedlichen Einbrennzeiten, -temperaturen aber auch der Menge an Lack pro m² und an der Art und Menge des Reaktionspartners liegt. Für die Konzentration der epoxidischen Verbindungen in den Coatingmigraten wurden Werte zwischen 18,5 und 835 µg/dm² bestimmt. Dies entspricht einem Anteil der reaktionsfähigen Substanzen an der Fraktion unter 1000 Da berechnet über die Flächen im Chromatogramm zwischen 2,6 und 76,3 %.

Neben dem Einsatz als Basismaterial für Konservendoseninnenbeschichtungen werden Epoxidharzsysteme auch in Zubereitungen wie Grundierungen, Füllmassen, Lacken oder Klebstoffen für die Bauchemie vielfach in verschiedenen Mischungen (aromatische, aliphatische oder cycloaliphatische Glycidylether bzw. Siloxanglycidylether) eingesetzt. Durch den Kontakt dieser Materialien mit der Haut kann es zu Kontaktekzemen kommen, deren Ursache durch Epikutantests (Patchtests) mit den potentiell auslösenden Substanzen ermittelt werden kann. Der Umfang der in den Standardtestsystemen enthalten Testsubstanzen entspricht dabei jedoch nicht dem Spektrum der in der Industrie verwendeten Materialien. Über die genaue Zusammensetzung der in den Patchtest's eingesetzten Materialien ist zudem wenig bekannt. Durch die Analyse einer Vielzahl von Patchtestsubstanzen und industriellen Epoxidkomponenten mittels RP-HPLC/USD bzw. -ELSD Chromatographie und die Identifizierung der enthaltenen Verbindungen über RP-

HPLC/ESI-MSD, konnte ein genaueres Bild über den Charakter dieser Materialien gewonnen werden. Bei den BPA- und BPF-Harzen wurden überwiegend Monomere, die entsprechenden Di- und Trimere aber auch dessen hydrolysierte Verbindungen identifiziert. Im Gegensatz dazu liegen bei den analysierten aliphatischen Produkten z. T. die reinen Glycidylether gar nicht oder nur in geringen prozentualen Anteilen vor. Vielmehr wird durch die sauer geführte Reaktion bei den aliphatischen Verbindungen die Bildung von 1,3-Chlorhydrinen als Nebenreaktion zur 1,2-Chlorhydrinbildung gefördert, wodurch eine beträchtliche Menge an Substanzen, die nicht verseifbares Chlor enthalten, in den Materialien vorhanden ist. Um die enthaltenen Verbindungen von aliphatischen und cycloaliphatischen Epoxidzubereitungen quantifizieren zu können, wurde eine Derivatisierung mit einem selbst synthetisierten Fluorophor (5-(Dimethylamino)-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalen-sulfonamid) entwickelt. Dadurch konnten auch Verbindungen erfasst werden, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit mittels ELSD nicht detektierbar waren.

Bei der Analyse von Handelsprodukten zeigte sich, dass die einzelnen Komponenten in ihrer Zusammensetzung gut mit den untersuchten aromatischen und aliphatischen Rohmaterialien vergleichbar sind. Bei entsprechend eingesetzten Patchtestsubstanzen spiegeln diese somit die Produkte gut wieder, mit denen die Patienten in Kontakt kommen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material

Probenmaterial

Für die Untersuchungen auf dem Gebiet der Phenolharze wurden vom Kooperationspartner *Valspar* verschiedene Harze, Modellcoatings und kommerzielle Coatings zur Verfügung gestellt:

Harze: - Phenolharz 1: Phenolresol (Feststoffgehalt 42 %, Lösungsmittel n-Butanol)

- Phenolharz 2: verethertes Phenolresol (Feststoffgehalt 63 %, Lösungsmittel n-Butanol)

- Phenolharz 3: verethertes Kresolresol (Feststoffgehalt 60 %, Lösungsmittel n-Butanol)

- Polyesterharz (Zusammensetzung: 1,2-Propylenglycol, 1,3-Propylenlycol, Trimethylolpropan, 1,4-Cyclohexandimethanol, Isophthalsäure, Terephthalsäure, $M \approx 2000$ g/mol, Feststoffgehalt 50 %, Lösungsmittel Solvesso 150/200)

- niedermolekulares Epoxidharz 1 (Zusammensetzung: u.a. BADGE, BADGE(n=1), BADGE(n=2), BADGE-H₂O, Cyclo-di-BADGE, Anzahl an Epoxidäquivalenten 1490 - 1640)

- niedermolekulares Epoxidharz 2

Modellcoatings: Coatings der oben genannten ersten 3 Phenolharze in Mischung mit dem Polyesterharz im Verhältnis 20 : 80, 7 – 7,5 g/m²

- Polyester-Phenol-Coating 1

- Polyester-Phenol-Coating 2

- Polyester-Phenol-Coating 3

kommerzielle Coatings: Epoxy-Phenol-Coating 1

Epoxy-Phenol-Coating 2

Epoxy-Phenol-Coating 3

Epoxy-Phenol-Coating 4

Epoxy-Anhydrid-Coating

Organosol-Coating

Polyester-Phenol-Coating 4

Des Weiteren wurden von folgenden Firmen unterschiedliche Phenolharze für diese Arbeit zur Verfügung gestellt:

Bakelite® AG: PF 9900 LB

PF 6806 LB

PF 0715 LG

PF 6535 LB

Schenectady Europe ^{S.A.S.}: SFC 138 B
 FB 210 B 60

Surface Specialities: Phenodur SPR 194
 Phenodur PR 401/72B
 Phenodur PR 515/60LG
 Phenodur PR 898/52BGB
 Phenodur PR 897/53BG/B
 Phenodur PR 308/62MP
 Phenodur PR 217/65B
 Phenodur PR 373/53BG/B

Für die Untersuchungen von aliphatischen Epoxidverbindungen in Verbindung mit einer möglichen Kontaktexzendiagnostik wurde vom Kooperationspartner *Hermal Chemie* verschiedenes Probenmaterial zur Verfügung gestellt:

BPA-Harz Araldit MY 740 von *Huntsman Advanced Materials*

BPF-Harz Epikote 862 von *Hexion Specialty Chemicals*

Hexandioldiglycidylether Polypox R18 von *UPPC AG*
 Bakelite EPD-HD von *Bakelite® AG*

Trimethylolpropantriglycidylether Erisys GE-30 von *CVC-Specialty Chemicals*
 Grilonit V 51-31 von *EMS-Primid*
 Bakelite EPD TP von *Bakelite® AG*

Phenylglycidylether von *Fluka*

Kresylglycidylether Grilonit RV 1805 von *EMS-Primid*

Außerdem wurden von den nachfolgend aufgeführten Firmen weitere Epoxidverbindungen bezogen:

UPPC AG C12/14-Alkylglycidylether Polypox R24
 Butandioldiglycidylether Polypox R3
 p-tert-Butylphenylglycidylether Polypox R7
 2-Ethylhexylglycidylether Polypox R17

CVC-Specialty Chemicals C12/14-Alkylglycidylether Erisys GE-8
 Butandioldiglycidylether Erisys GE-21
 p-tert-Butylphenylglycidylether Erisys GE-11
 2-Ethylhexylglycidylether Erisys GE-6
 Neopentylglycoldiglycidylether Erisys GE-20
 Polypropylenglycoldiglycidylether Erisys GE-23

<i>EMS-Primid</i>	C12/14-Alkylglycidylether Grilonit Epoxide 8 C13/15-Alkylglycidylether Grilonit RV 1814 Butandiol diglycidylether Grilonit RV 1806 p-tert-Butylphenylglycidylether Grilonit RV 1802 Polypropylenglykoldiglycidylether Grilonit F 704
<i>Bakelite® AG</i>	C13/15-Alkylglycidylether EPD-ML Butandiol diglycidylether Grilonit EPD-BD p-tert-Butylphenylglycidylether Grilonit EPD-AQ 2-Ethylhexylglycidylether EPD-EHS Neopentylglycoldiglycidylether EPD-NE
<i>Huntsman Advanced Materials</i>	C12/14-Alkylglycidylether Araldit DY-E Hexandiol diglycidylether Araldit DY-H Cyclohexandimethanoldiglycidylether Araldit DY-C

Aus dem Handel wurden zudem folgende kommerzielle Produkte erworben:

2-Komponentenkleber UHU – plus schnellfest von *UHU GmbH & Co. KG*

Gießharz Epoxidharz L von *R&G Faserverbundwerkstoffe*

Wärmeleitfähiges Epoxidharz – 2-Komponentenkleber Hysol 9496 von *Loctite Deutschland GmbH*

Disboxid 438 EP-Spachtel von *Caparol Farben Lacke Bautenschutz GmbH*

Anionenaustauschermaterialien

Dow Chemical, Amsterdam, Niederlande: Dowex 1X2, 200 - 400 mesh
Dowex 1X4, 100 - 200 mesh
Dowex Marathon MSA (640 ± 50 µm)

J.T.Baker Inc., Phillipsburg, USA: Bakerbond - spe (quarternary amine)

Macherey-Nagel, Düren: Chromafix® PS-OH

Varian Deutschland GmbH, Darmstadt: Bond Elut Certify II, Bond Elut PPL, SPEC SAX

Kationenaustauschermaterialien

Dow Chemical, Amsterdam, Niederlande: Dowex 50WX8, mesh 200 - 400
Dowex 50WX2, mesh 200 - 400

J.T.Baker Inc., Phillipsburg, USA: Bakerbond - spe (aromatic sulfonic acid)

Macherey-Nagel, Düren: Chromafix® PS-H

Varian Deutschland GmbH, Darmstadt: Bond Elut LRC PRS

5.2 Geräteverzeichnis

Geräte

Analysenwaagen	Sartorius BP 121 S und Sartorius BP 3100 S, Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmessgerät	SFM 25, Bio-Tek, Kontron Instruments
Heiz- und Verdampferstation	Reacti-Therm Heating/Stirring Module™, Modell 18971 Reacti-Vap Evaporating Unit, Modell 18780 Pierce, Rockford, Illinois, USA
IR-Spektrometer	Perkin Elmer System 2000 FT-IR Software: Spectrum V3.02, Version 3.02.01, Copyright© 2000 Perkin Elmer, Inc TF
Kolbenhubpipetten	verschiedene Volumina, Eppendorf Nethler Hinz GmbH, Hamburg sowie Gilson S.A.S. S.F-Villiers-le-Bel
Magnetrührwerk	MLW R3, VEB MLW, Prüfgeräte-Werk, Medingen; Freital
Minishaker	MS 1, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC
pH-Messgerät	WTW pH 525, WTW GmbH, Weilheim i. OB,
Rotationsverdampfer	Heidolph VV 2000, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG Kelheim
Trockenschrank	Memmert Typ ULM 500, Memmert GmbH & Co. KG Schwabach
Ultraschallgerät	Bandelin Sonrex RK 100, Bandelin Electronics, Berlin
UV Spektrometer	Specord S 100, Carl Zeiss Technology Software: Aspect Plus Version 1.5, Copyright© 1993-97 Carl Zeiss Jena GmbH
Vakuumkammer	Chromabond®, Macherey-Nagel, Düren
Vakuumpumpe	Vakuubrand Typ MZ 2C, Vakuubrand GmbH & Co. Wertheim
Vakuumtrockenschrank	ATP Line VD 23, Binder GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge	eppendorf Centrifuge 5804R

HPLC-Anlagen:

1. Merck Hitachi Niederdruckgradienten-System (Merck KGaG, Darmstadt)
bestehend aus: Interface (D-7000, La Chrom), Degasser (ERC 3415α, ERC Riemeling), Pumpe (L-7100, La Chrom), Autosampler (L-7200, La Chrom), Säulentermostat (L-7360, La Chrom), UV-Detektor (L-7400, La Chrom) und ERC Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (ELSD) (SEDEX 75), Kühlbad (RM 6T Lauda - Dr. R. Wobser GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen), Auswertesystem (MERCK-HITACHI-MODEL D-7000, Chromatography Data Station Software, HPLC – System Manager, Version 4.1),

2. Merck Hitachi Niederdruckgradienten-System (Merck KGaG, Darmstadt)

bestehend aus: Interface (D-7000, La Chrom), Degasser (ERC 3415 α), Pumpe (L-7100, La Chrom), Autosampler (L-7200, La Chrom), Säulenthmostat (L-7360, La Chrom), DAD-Detektor (L-7455, La Chrom), Fluoreszenzdetektor (L-7485, La Chrom), Auswertesystem (MERCK-HITACHI-MODEL D-7000, Chromatography Data Station Software, HPLC – System Manager, Version 4.1)

Agilent 1100 Series Hochdruckgradienten-System (Agilent Technology, Waldbronn)

bestehend aus: Interface (35900 E), Degasser (G 1322 A), Pumpe (G 1312 A), Autosampler (G 1329 A), Säulenofen (G 1316 A), DAD-Detektor (G 1315 A), UV-Detektor (G 1314 A), CLND (Antek, Modell 8060)

LC-MS

Agilent 1100 Series Hochdruckgradienten-System (Agilent Technology, Waldbronn)

bestehend aus: Degasser (G 1322 A), Pumpe (G 1312 A), Autosampler (G 1329 A), Säulenofen (G 1316 A), DAD-Detektor (G 1315 A), Massenselektiver Detektor (Biospectrometry Workstation Mariner TM, G 1322 A), Auswertesystem (Applied Biosystems Mariner System 5267)

Merck Hitachi präparative HPLC (Merck KGaG, Darmstadt)

bestehend aus: Pumpe (L-6000A), Autosamper (L-7200, La Chrom), UV-Detektor (655 A), Integrator (D 2500), Fraktionssammler (Advantec SF 3120)

5.3 Methoden und Synthesen

5.3.1 Derivatisierung von Hydroxylgruppen mit Picolinsäure nach Mukaiyama

1 Zweck und Anwendungsbereich

In dieser Vorschrift wird ein Verfahren beschrieben, mit dem durch Veresterung nach Mukaiyama, die Gesamtzahl der in einer Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen bestimmt werden kann.

2 Begriffsbestimmung

In Phenolharzen können sowohl phenolische als auch methylole Hydroxylgruppen enthalten sein. Um die Strukturen unbekannter Verbindungen in Phenolharzen besser bestimmen zu können, ist es notwendig, die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen zu kennen.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchenden Verbindungen werden isoliert und die in ihnen enthaltenen Hydroxylgruppen mittels Picolinsäure über einen Kuppler (2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid) verestert. Die so erhaltenen Ester werden hochleistungs-flüssigchromatographisch über UV-Detektion bei 220 nm sowie mittels RP-HPLC/ESI-MSD bestimmt. Die Veresterung einer Hydroxylgruppe ist mit einer Massenzunahme von 105 Da verbunden. Aus der Massendifferenz der veresterten und unveresterten Verbindung kann die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen berechnet werden.

4 Störungen

Neben Verbindungen, mit Hydroxylgruppen können auch Substanzen wie Thiole und Amine bei der Derivatisierung nach Mukaiyama reagieren.

5 Chemikalien

5.1 verwendete Chemikalien

5.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]

5.1.2 Ameisensäure 85% p.a. [64-18-6]

5.1.3 Ammoniak 25% p.a. [1336-21-6]

5.1.4 2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid Reinheit $\geq 99\%$ [14338-32-0]

5.1.5 Picolinsäure, $\geq 99\%$ [98-98-6]

5.1.6 Triethylamin, $> 99,5\%$ [122-44-8]

5.1.7 Wasser bidestilliert

5.2 verwendete Lösungen

5.2.1 Ammoniaklösung, $c = 10 \text{ mmol/l}$

0,75 ml der 25%igen Ammoniaklösung (5.1.3) werden auf 1000 ml mit bidest. Wasser (5.1.7) aufgefüllt.

5.2.2 Ammoniumformiatpuffer, 1 mM pH 3

100 ml der Ammoniaklösung (5.2.1) werden mit Ameisensäure (5.1.2) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und mit bidest. Wasser (5.1.7) auf 1000 ml aufgefüllt.

5.3 HPLC-Eluenten

5.3.1 Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.2.2)

5.3.2 Eluent B: Acetonitril (5.1.1)

6 Durchführung

6.1 Veresterung

Die Probelösung wird in ein Reaktionsvial von 1,5 ml Volumen eingebracht und das enthaltene Lösungsmittel aus dem System entfernt. Anschließend werden zum Rückstand 250 ml Acetonitril (5.1.1) und 10 ml Triethylamin (5.1.6) pipettiert sowie 10 mg 2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid (5.1.4) und 4 mg Picolinsäure-Lösung (5.1.5) zugewogen. Der Reaktionsansatz wird für 4 h bei 85 °C inkubiert. Anschließend wird mit 250 µl Wasser (5.1.7) auf 500 µl aufgefüllt die Probe danach der HPLC direkt zugeführt.

6.2 RP-HPLC – Bedingungen

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.3.1)

Eluent B: Acetonitril (5.3.2)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
25	0	100
40	0	100
41	60	40
50	60	40

Detektion: UVD 220 nm

7 Auswertung

Die interessierenden Verbindungen werden über die UV-Absorption bei 220 nm identifiziert und das entsprechende Molekulargewicht anhand des Massenspektrums ermittelt. Um die Anzahl der

im Molekül enthaltenen Hydroxylgruppen zu bestimmen, wird die Massendifferenz zwischen unveresterter und veresterter Verbindung errechnet. Da pro veresterte Hydroxylgruppe eine Massenzunahme von 105 Da erfolgt, muss diese Massendifferenz ein Vielfaches davon betragen. Der resultierende Faktor entspricht der Anzahl aller in der Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen. Als Hinweis auf die Anwesenheit einer phenolischen Hydroxylgruppe im Molekül gilt das Vorhandensein des Fragmentes m/z von 106 Da. Es entsteht bei der Spaltung der Esterbindung zwischen Picolinsäure und phenolischer Hydroxylgruppe. Das Auftreten der Differenz von 122 Da zwischen Fragmenten oder Molmasse und Fragment ist dagegen ein Indikator für die Anwesenheit einer methylolischen Hydroxylgruppe.

8 Beispielchromatogramm

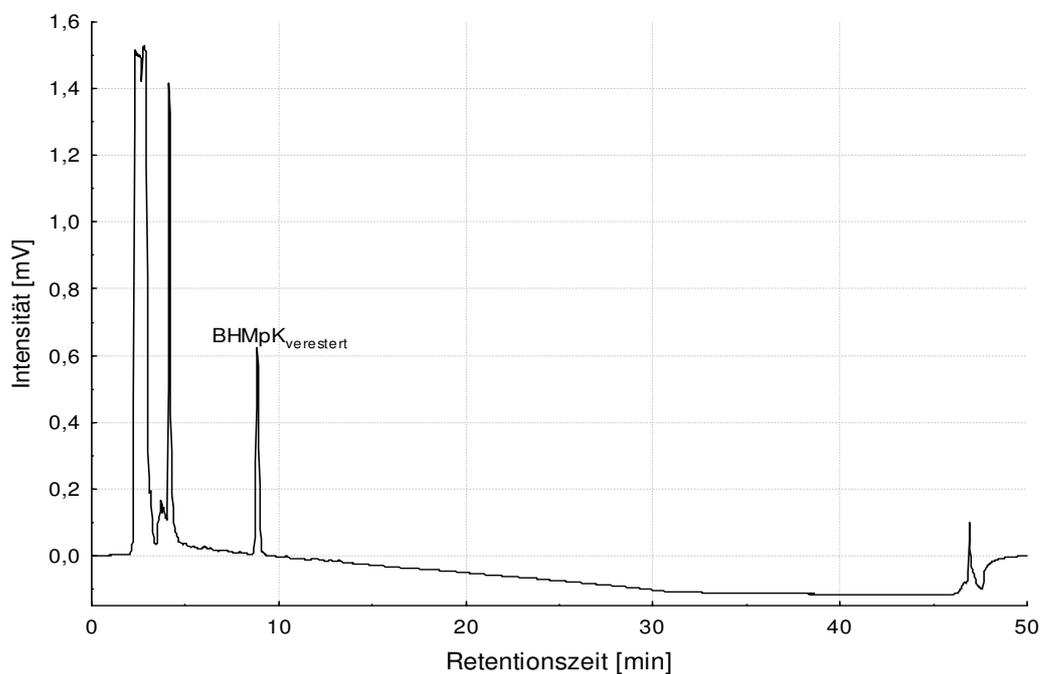


Abb. 5.1: RP-HPLC/UV_{D220nm}-Chromatogramm des mit Picolinsäure veresterten Standards 2,6-Bis(hydroxymethyl)-p-kresol (BHMpK)

5.3.2 Acetylierung von Hydroxylgruppen

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Vorschrift umfasst ein Verfahren, welches die Bestimmung aller in einer Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen durch Veresterung mit Essigsäureanhydrid ermöglicht.

2 Begriffsbestimmung

Phenolharze können neben den phenolischen auch methylolische Hydroxylgruppen enthalten. Die Kenntnis über die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen vereinfacht die Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchenden Verbindungen werden aus dem Phenolharz isoliert und durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid verestert. Die Bestimmung der Derivate erfolgt hochleistungsflüssigchromatographisch über UV-Detektion bei 220 nm sowie mittels RP-HPLC/ESI-MSD. Die Veresterung einer Hydroxylgruppe ist mit einer Massenzunahme von 42 Da verbunden, folglich ergibt sich aus der Massendifferenz von underivatisierter und veresteter Verbindung die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen.

4 Störungen

Neben Verbindungen, mit Hydroxylgruppen können auch Substanzen wie Thiole, Thiophenole, primäre und sekundäre Amine acetyliert werden.

5 Chemikalien

5.1 verwendete Chemikalien

5.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]

5.1.2 Ameisensäure 85 % p.a. [64-18-6]

5.1.3 Ammoniak 25 % p.a. [1336-21-6]

5.1.4 Essigsäureanhydrid p.a. [108-24-7]

5.1.5 Pyridin p.a. [110-86-1]

5.1.6 Wasser bidestilliert

5.2 verwendete Lösungen

5.2.1 Ammoniaklösung, $c = 10 \text{ mmol/l}$

0,75 ml der 25 %igen Ammoniaklösung (5.1.3) werden auf 1000 ml mit bidest. Wasser (5.1.6) aufgefüllt

5.2.2 Ammoniumformiatpuffer, 1 mM pH 3

100 ml der Ammoniaklösung (5.2.1) werden mit Ameisensäure (5.1.2) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und mit bidest. Wasser (5.1.6) auf 1000 ml aufgefüllt

5.3 HPLC-Eluenten

5.3.1 Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.2.2)

5.3.2 Eluent B: Acetonitril (5.1.1)

6 Durchführung

6.1 Veresterung

Die Probelösung wird in ein Reaktionsvial von 1,5 ml Volumen eingebracht und das enthaltene Lösungsmittel aus dem System entfernt. Es werden 50 µl Pyridin (5.1.5) und 200 µl Essigsäureanhydrid (5.1.4) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 35 min bei RT stehen gelassen und anschließend bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 500 µl Acetonitril (5.1.1) aufgenommen danach mit weiteren 500 µl Ammoniumformiatpuffer (5.2.2) verdünnt. Die Probe wird anschließend noch 15 min im Ultraschallbad behandelt und dann der HPLC direkt zugeführt.

6.2 HPLC-Bedingungen

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.3.1)

Eluent B: Acetonitril (5.3.2)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
25	0	100
40	0	100
41	60	40
50	60	40

Detektion: UVD 220 nm

7 Auswertung

Der gesuchte Peak wird über die UV-Absorption bei 220 nm identifiziert und das entsprechende Molekulargewicht anhand des Massenspektrums ermittelt. Um die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen zu bestimmen, wird die Massendifferenz zwischen unveresterter und veresterter Verbindung errechnet. Da pro veresterte Hydroxylgruppe eine Massenzunahme von 42 Da erfolgt, muss diese Massendifferenz ein Vielfaches davon betragen. Der resultierende Faktor entspricht der Anzahl aller in der Verbindung enthaltenen Hydroxylgruppen.

8 Beispielchromatogramm

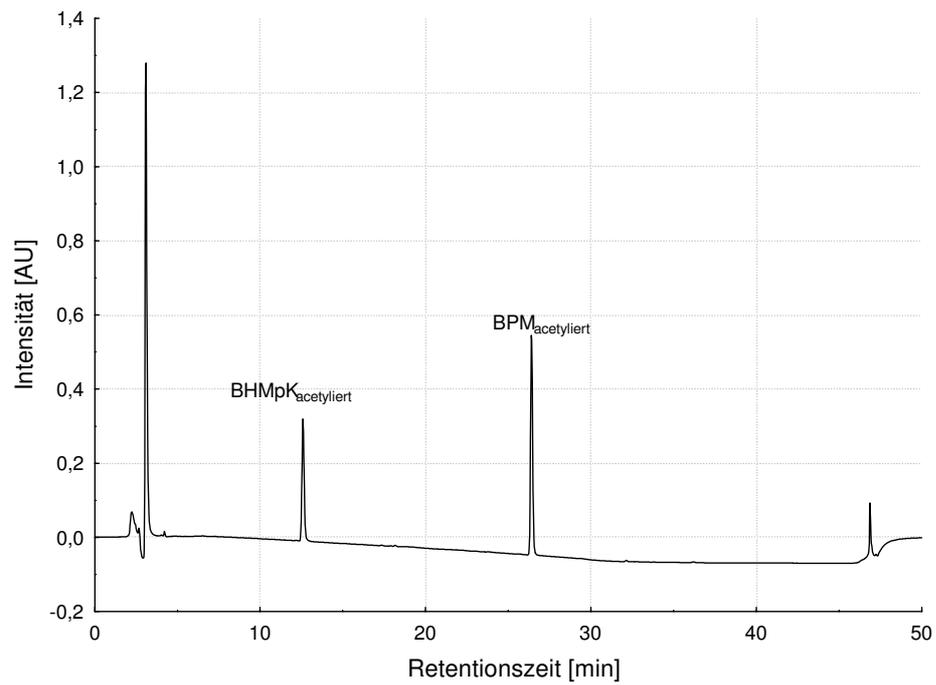


Abb. 5.2: RP-HPLC/UV_{220nm}-Chromatogramm des acetylierten Standards 2,6-Bis(hydroxymethyl)-p-kresol (BHMpK) und 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol (BPM)

5.3.3 Dansylierung von phenolischen Hydroxylgruppen mit Dansylchlorid

1 Zweck und Anwendungsbereich

In dieser Vorschrift wird ein Verfahren beschrieben, mit dem durch Reaktion mit Dansylchlorid alle in einer Verbindung enthaltenen phenolischen Hydroxylgruppen derivatisiert werden und folglich die Bestimmung der Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen möglich ist.

2 Begriffsbestimmung

Phenolharze können neben den phenolischen auch methyloische Hydroxylgruppen enthalten. Die Kenntnis über die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen phenolischen Hydroxylgruppen vereinfacht die Strukturaufklärung der unbekanntenen Verbindung.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchende Verbindung wird aus dem Phenolharz isoliert und durch Reaktion mit Dansylchlorid umgesetzt. Die Bestimmung des Produktes erfolgt hochleistungsflüssigchromatographisch über UV-Detektion (220 nm). Das jeweilige Molekulargewicht erhält man durch eine RP-HPLC/ESI-MSD-Bestimmung. Die Dansylierung einer Hydroxylgruppe ist mit einer Massenzunahme von 233 Da verbunden, folglich ergibt sich aus der Massendifferenz von dansylierter und underivatisierter Verbindung die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen phenolischen Hydroxylgruppen.

4 Störungen

Neben Verbindungen mit phenolischen Hydroxylgruppen werden auch Amine dansyliert.

5 Chemikalien

5.1 verwendete Chemikalien

- 5.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]
- 5.1.2 Ameisensäure 85 % p.a. [64-18-6]
- 5.1.3 Ammoniak 25 % p.a. [1336-21-6]
- 5.1.4 Dansylchlorid Reinheit ≥ 99 % [605-65-2]
- 5.1.5 Ethanolamin rein [141-43-5]
- 5.1.6 Natriumcarbonat Reinheit ≥ 99 % [497-19-8]
- 5.1.7 Wasser bidestilliert

5.2 verwendete Lösungen

5.2.1 Ammoniaklösung, $c = 10$ mmol/l

0,75 ml der 25 %igen Ammoniaklösung (5.1.3) werden auf 1000 ml mit bidest. Wasser (5.1.7) aufgefüllt

5.2.2 Ammoniumformiatpuffer, 1 mM pH 3

100 ml der Ammoniaklösung (5.2.1) werden mit Ameisensäure (5.1.2) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und mit bidest. Wasser (5.1.7) auf 1000 ml aufgefüllt

5.2.3 Dansylchloridlösung

40 mg Dansylchlorid (5.1.4) werden in 4 ml Acetonitril (5.1.1) gelöst

5.2.4 Natriumcarbonatlösung, c = 1 mol/l

1,06 g Natriumcarbonat (5.1.6) werden in 10 ml Wasser (5.1.7) gelöst

5.3 HPLC-Eluenten

5.3.1 Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.2.2)

5.3.2 Eluent B: Acetonitril (5.1.1)

6 Durchführung

6.1 Dansylierung

Die Probelösung wird in ausreichender Konzentration in ein Reaktionsvial von 1 ml Volumen eingebracht und das enthaltene Lösungsmittel aus dem System entfernt. Es werden 130 µl Acetonitril (5.1.1), 15 µl Natriumcarbonat (5.1.6), 200 µl Dansylchlorid (5.2.3) sowie 85 µl Wasser (5.1.7) zugegeben.

Der Reaktionsansatz wird für 2 h bei 65 °C im Trockenschrank stehen gelassen. Anschließend werden 20 µl Ethanolamin (5.1.5) und 50 µl Wasser (5.1.7) hinzugefügt und nochmals für 5 min bei RT stehen gelassen. Wenn die Notwendigkeit besteht wird die Probe abschließend filtriert.

6.2 HPLC-Bedingungen

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (5.3.1)

Eluent B: Acetonitril (5.3.2)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient

t [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
25	0	100
40	0	100
41	60	40
50	60	40

Detektion: UVD 220 nm

7 Auswertung

Der gesuchte Peak wird über die UV-Absorption bei 220 nm identifiziert und das entsprechende Molekulargewicht anhand des Massenspektrums ermittelt. Um die Anzahl der in der untersuchten Verbindung enthaltenen phenolischen Hydroxylgruppen zu bestimmen, wird die Massendifferenz zwischen dansylierter und veresterter Verbindung errechnet. Da pro phenolischer Hydroxylgruppe eine Massenzunahme von 233 Da erfolgt, muss diese Massendifferenz ein Vielfaches davon betragen. Der resultierende Faktor entspricht der Anzahl aller in der Verbindung enthaltenen phenolischen Hydroxylgruppen.

8 Beispielchromatogramm

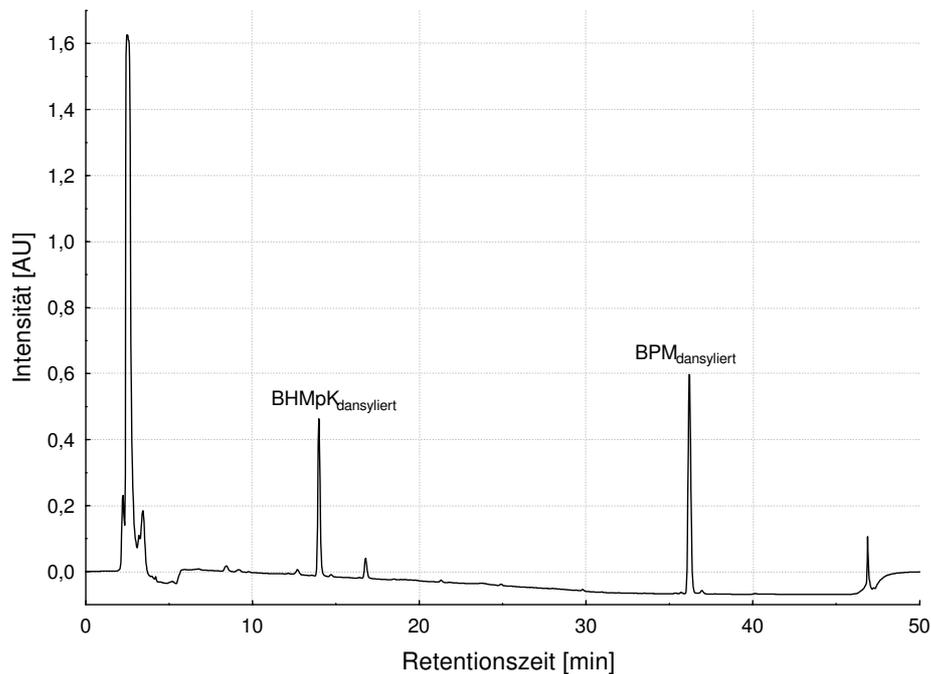


Abb. 5.3: RP-HPLC/UV_{D220nm}-Chromatogramm der dansylierten Standards 2,6-Bis(hydroxymethyl)-p-kresol (BHMpK) und 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol (BPM)

5.3.4 Isolierung phenolischer Verbindungen

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung phenolischer Verbindungen in Coatingmigraten.

2 Begriffsbestimmung

Die Menge an migrierenden phenolischen Verbindungen wird nach dem hier beschriebenen Verfahren in Summe bestimmt.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die in den Coatingmigraten enthaltenen phenolischen Verbindungen werden als Phenolate mittels Anionenaustauscher aus der Probe entfernt. Das phenolfreie Eluat wird mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender Fluoreszenz (FLD)-Detektion analysiert. Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme vor und nach der Festphasenextraktion ermöglicht eine Identifizierung der Phenole. Diese Verbindungen können anschließend im Chromatogramm des Gesamtmigrates quantitativ erfasst und deren Menge über Kalibriergeraden verschiedener Phenolharze abgeschätzt werden.

4 Chemikalien

4.1 verwendete Chemikalien

- 4.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]
- 4.1.2 Ameisensäure 85 % p.a. [64-18-6]
- 4.1.3 Ammoniak 25 % p.a. [1336-21-6]
- 4.1.4 Calciumoxid rein [1305-78-8]
- 4.1.5 Ethanol abs. [64-17-5]
- 4.1.6 Isopropanol rein. [67-63-0]
- 4.1.7 Methanol HPLC-grade [67-56-1]
- 4.1.8 Trinatriumphosphat Dodecahydrat [10101-89-0]
- 4.1.9 Wasser bidestilliert

4.2 verwendete Lösungen

4.2.1 Ammoniaklösung, $c = 10 \text{ mmol/l}$

0,75 ml der 25 %igen Ammoniaklösung (4.1.3) werden auf 1000 ml mit bidest. Wasser (4.1.9) aufgefüllt

4.2.2 Ammoniumformiatpuffer, 1 mM pH 3

100 ml der Ammoniaklösung (4.2.1) werden mit Ameisensäure (4.1.2) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und mit bidest. Wasser (4.1.9) auf 1000 ml aufgefüllt

- 4.2.3 95 % Ethanol (v/v)
95 ml Ethanol (4.1.5) werden mit 5 ml Wasser (4.1.9) versetzt
- 4.2.4 Trinatriumphosphatlösung, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
19,0 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4.1.8) werden in 100 ml Wasser (4.1.9) gelöst
- 4.3 SPE - Elutionsmittel
- 4.3.1 Elutionsmittel 1: Acetonitril (4.1.1)
- 4.3.2 Elutionsmittel 2: 90 ml Acetonitril (4.1.1), 5 ml Ameisensäure (4.1.2) und 5 ml Wasser (4.1.9) werden gemischt
- 4.4 HPLC-Eluenten
- 4.4.1 Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (4.2.2)
- 4.4.2 Eluent B: Acetonitril (4.1.1)
- 4.4.3 Eluent C: Isopropanol (4.1.6)
- 2h über CaO (4.1.4) unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert

4.5 verwendete Materialien

- 4.5.1 Festphase: Macherey-Nagel, Düren: Chromafix[®] PS-OH
- 4.5.2 Universalindikatorpapier

5 Durchführung

5.1 Migration

Von dem vorliegenden Coatingmaterial werden 2 dm^2 in 50 ml Ethanol (4.1.5) bei $4 \text{ h } 60 \text{ }^\circ\text{C}$ migriert.

5.2 Festphasenextraktion

Säulenkonditionierung: Es werden nacheinander auf die Festphase (4.5.1) gegeben.

- 5 ml Methanol (4.1.7)
- 5 ml Elutionsmittel 2 (4.3.2)
- Wasser zur Neutralisation (4.1.9)
- 5 ml Trinatriumphosphat (4.2.4)
- Wasser zur Neutralisation (4.1.9)
- 5 ml Ethanol (4.1.5)

Probenaufgabe/1. Elution: - 20 ml der nach 5.1 erhaltenen Probe werden auf die

Festphase gegeben und in einen 25 ml Messkolben eluiert

- anschließend werden 5 ml Elutionsmittel 1 (4.3.1) auf die Phase gegen und in den gleichen Meßkolben bis zur Eichmarke eluiert

2. Elution:

- 5 ml Elutionsmittel 2 (4.3.2) werden in einen 5 ml Messkolben

Das 1. Eluat wird direkt oder nach Konzentrierung der HPLC-Messung zugeführt. Das 2. Eluat wird direkt nach entsprechend notwendiger Verdünnung mittels RP-HPLC/FLD oder RP-HPLC/UVD analysiert.

5.3 Vergleichschromatogramm des Gesamtmigrates

400 µl des nach 5.1 hergestellten Migrates werden in ein 1,5 ml Vial pipettiert und mit 100 µl 95 % Ethanol (4.2.3) versetzt und anschließend direkt in die HPLC injiziert.

Epoxy-Phenol-Coatingmigrates werden mittels Fluoreszenz, Polyester-Phenol-Coatings im UV detektiert.

5.4 HPLC-Bedingungen

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (4.4.1)

Eluent B: Acetonitril (4.4.2)

Eluent C: Isopropanol (4.4.3)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	50	50	0
45	5	95	0
70	5	95	0
71	0	0	100
80	0	0	100
81	50	50	0
90	50	50	0

Detektion: FLD Ex.: 275 nm; Em.: 305 nm

UVD 220 nm

6 Auswertung

Während der ersten Elution eluieren die nichtphenolischen Verbindungen. Im 2. Eluat sind Phenole und Säuren enthalten. Im Vergleich der Chromatogramme der Festphasenextraktion und des Gesamtmigrates können die im Migrat enthaltenen Phenole identifiziert werden. Über den prozentualen Flächenanteil dieser Verbindung kann der Gehalt an phenolischen Substanzen abgeschätzt werden.

7 Beispielchromatogramm

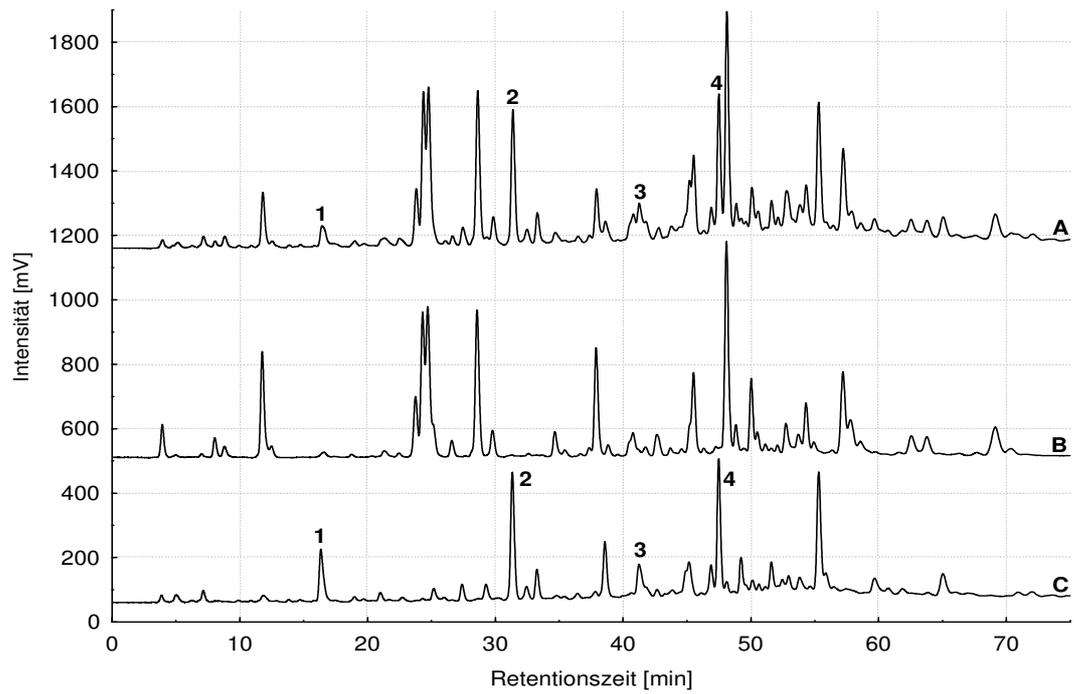


Abb. 5.4: RP-HPLC/FLD_{275/305 nm}-Chromatogramme eines Epoxid-Phenol-Coatingmigrats, **A**...vor der SPE, **B**...1. Eluat, **C**...2. Eluat (nummerierte Verbindung sind Phenole)

5.3.5 Darstellung von Phenololigomeren

1 Chemikalien

1.1 verwendete Chemikalien

- 1.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]
- 1.1.2 Chloroform HPLC-grade [67-66-3]
- 1.1.3 4-Hydroxymethylphenol (4-HMP) 99 % [623-05-1]
- 1.1.4 Natriumborhydrid (NaBH_4) p. a. 95 % [16940-66-2]
- 1.1.5 Natriumhydroxid (NaOH) p. a. [1310-73-2]
- 1.1.6 Natriumsulfat wasserfrei [7757-82-6]
- 1.1.7 tert-Methylbutylether (MtBE) rein [1634-04-4]
- 1.1.8 Natriumhydroxyd (NaOH) reinst [1310-73-2]
- 1.1.9 Tetrahydrofuran (THF) [13595-25-0]
- 1.1.10 Wasser, bidestilliert

1.2 verwendete Lösungen

1.2.1 Natriumhydroxidlösung, 0,5 M

2 g NaOH (1.1.5) werden in 100 ml bidest. Wasser (1.1.10) gelöst

1.2.2 Extraktionsmittel

Chloroform (1.1.2) und MtBE (1.1.7) werden im Verhältnis 7 : 3 (v/v) gemischt

1.3 HPLC-Eluenten

1.1.1 präparative SEC-HPLC

THF (1.1.9) destilliert über NaOH (1.1.5) und NaBH_4 (1.1.4)

1.1.2 präparative und analytische NP-HPLC

Chloroform/MtBE in verschiedenen Verhältnissen (v/v)

- Chloroform (1.1.2) vor der Verwendung destilliert
- MtBE (1.1.7) vor Verwendung über NaBH_4 (1.1.4) destilliert

1.1.3 RP-HPLC

Eluent A: Wasser, bidestilliert (1.1.10)

Eluent B: Acetonitril (1.1.1)

1.4 DC-Laufmittel

Chloroform und MtBE werden im Verhältnis 70 : 30 (v/v) gemischt

- Chloroform (1.1.2) vor der Verwendung destilliert
- MtBE (1.1.7) vor Verwendung über NaBH_4 (1.1.4) destilliert

2 Durchführung

2.1 Darstellung

5 g 4-HMP (1.1.3) werden in 50 ml Wasser (1.1.10) gelöst und die Lösung mit 0,5 M NaOH (1.2.1) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend eine Stunde bei 100 °C unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen im Wasserbad wird die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit je 50 ml Extraktionsmittel (1.2.2) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen. Die organischen Phasen werden vereinigt und 24 Stunden über Natriumsulfat (1.1.6) getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit THF (1.1.9) aufgenommen.

2.2 Isolierung

Das Oligomergemisch wird mittels präparativer SEC in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Aufnahme der einzelnen Fraktionen in Chloroform/MtBE (80/20, v/v) erfolgt zunächst die Optimierung der Trennung über die analytische NP-HPLC. Die ermittelten chromatographischen Bedingungen werden dann auf die präparative NP-HPLC übertragen. Nach erfolgter Isolierung der phenolischen Oligomere wird das Elutionslösemittel entfernt und die Reinheit der Verbindungen mittels RP-HPLC überprüft. Zur weiteren Reinigung der Substanzen kann eine analytische mit anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie verwendet werden. Bei den dafür verwendeten Platten wird zunächst ein Vorlauf mit Methanol durchgeführt. Die Auftrennung der Substanzen erfolgt über eine Dreifachentwicklung in einer gesättigten Kammer. Die über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm detektierten Phenole werden unter Verwendung des Extraktionsmittels (1.2.2) vom Plattenmaterial gelöst.

2.3 Chromatographiebedingungen

2.3.1 präparative SEC

Stationäre Phase: SDV[®] 1000 Å, 5µ, 20-300 mm

Mobile Phase: THF (1.1.9)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 5 ml/min

Gradient:

t [min]	THF [%]
0	100
15	100

Detektion: UVD 295 nm

analytische NP-HPLC

Stationäre Phase: Kromasil Si 100-5µ; 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Chloroform/MtBE in verschiedenen Verhältnissen (v/v)

Säulentemperatur: 25 °C
Fluss: 0,5 ml/min
Gradient: isokratisch, 30 min,
Detektion: UVD 273 nm

2.3.2 präparative NP-HPLC

Stationäre Phase: Kromasil Si 100-7 μ ; 250·20 mm; 80·20 mm Vorsäule
Mobile Phase: Chlorform/MtBE in verschiedenen Verhältnissen (v/v)
Säulentemperatur: 25 °C
Fluss: 22 ml/min
Gradient: isokratisch, 30 min
Detektion: UVD 273 nm

2.3.3 RP-HPLC

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 μ , 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule
Mobile Phase: Eluent A: Wasser (1.1.10)
Eluent B: Acetonitril (1.1.1)
Säulentemperatur: 30 °C
Fluss: 0,5 ml/min

Gradient

t [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
15	75	25
45	22	78
46	90	10
55	90	10

Detektion: UVD 273 nm

DC

Stationäre Phase: analytisch Merck Si60 F₂₅₄
präparativ Merck PSC-Fertigplatte Si60 F₂₅₄
Mobile Phase: Chlorform/MtBE (70/30 v/v) (1.4)
gesättigte Kammer
Detektion: UV_{254 nm}

3 Instrumentelle Charakterisierung der Verbindungen

Im Folgenden ist ersichtlich, dass die zur Elementaranalyse eingesetzten Proben offensichtlich noch Lösungsmittel enthielten, wodurch die Ergebnisse stark von den erwarteten Werten abweichen. Aus gleichem Grund sind die Signale in den NMR-Spektren z. T. von geringer Intensität, so dass nicht in jedem Fall eine Zuordnung möglich war.

5-Hydroxymethyl-2,4'-dihydroxydiphenylmethan (M 230)

1 Reinheit : 90 % (HPLC/UVD_{273nm})

2 Strukturanalytik

3.1 UV (Acetonitril/Wasser): 205 nm (max), 227 nm (max), 280 nm (max)

3.2 Elementaranalyse

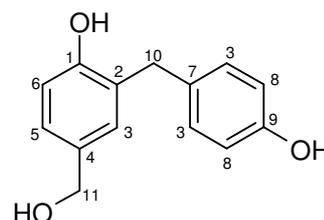
C₁₄H₁₄O₃ (230,27 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	73,02	66,90
H	6,13	5,75

3.3 ¹³C-NMR

500 MHz, MeOH-D₄

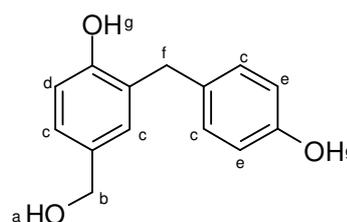
δ = 156,25 (C-9), δ = 155,54 (C-1), δ = 133,56 (C-7),
 δ = 133,36 (C-4), δ = 130,88 (C-3), δ = 129,63 (C-2),
 δ = 127,42 (C-5), δ = 115,94 (C-8), δ = 115,81 (C-6),
 δ = 68,32 (C-11), δ = 35,69 (C-10) ppm



3.4 ¹H-NMR

500 MHz, MeOH-D₄

δ = 7,11 (H-c, m, 4H), δ = 6,83 (H-d, d, 1H), δ = 6,74
 (H-e, dd, 2H), δ = 4,50 (H-b, s, 2H), δ = 3,89 (H-f, s,
 2H), δ = 3,41 (H-a, s, 1H) ppm



3.5 ESI-MS

positiv, 248 (M+NH₄⁺), 253 (M+Na⁺), 269 (M+K⁺)

negativ, 229 (M-H)

3.6 IR

KBr, 514 (w), 781 (m), 823 (m); 893 (w), 914 (w), 995 (w), 1049 (m), 1109 (m), 1238 (s),
 1366 (m), 1441 (m), 1512 (s), 1613 (m), 1706 (w), 2921 (s), 3307 (s),

2,4-Bis(4-hydroxybenzyl)-phenol (M 306)1 Reinheit: 92 % (HPLC- UVD_{273nm})

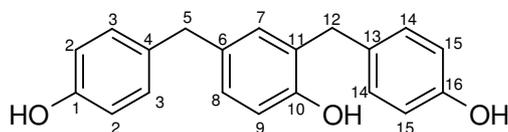
2 Strukturanalytik

2.1 UV (Acetonitril/Wasser): 205 nm (max), 228 nm (max), 280 nm (max)

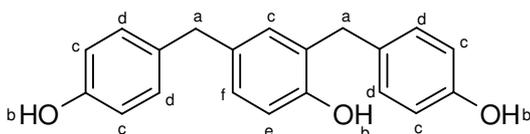
2.2 Elementaranalyse

C₂₀H₁₈O₃ (306,36 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	78,41	69,34
H	5,92	6,31

2.3 ¹³C-NMR500 MHz, MeOH-D₄

$\delta = 156,22/156,35$ (C-1/C-16), $\delta = 154,78$ (C-10), $\delta = 134,12/134,35$ (C-4/C-6), $\delta = 133,67$ (C-13), $\delta = 131,86$ (C-7), $\delta = 130,78$ (C-14), $\delta = 130,65$ (C-3), $\delta = 129,46$ (C-11), $\delta = 128,23$ (C-8), $\delta = 116,00$ (C-9), $\delta = 115,86/115,89$ (C-2/C-15), $\delta = 41,17$ (C-5), $\delta = 35,76$ (C-12) ppm

2.4 ¹H-NMR500 MHz, MeOH-D₄

$\delta = 7,06$ (H-f, d, 1H), $\delta = 6,99$ (H-e, d, 1H), $\delta = 6,85$ (H-d, s, 1H), $\delta = 6,73$ (H-c, m, 5H), $\delta = 3,82$ (H-a, s, 4H) ppm

2.5 ESI-MS

positiv, 324 (M+NH₄⁺), 329 (M+Na⁺), 345 (M+K⁺)

negativ, 305 (M-H)

2.6 IR

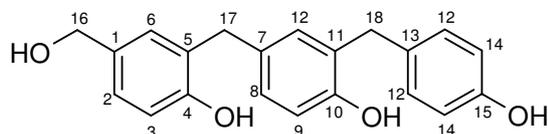
KBr, 509 (w), 699 (w), 778 (w); 819 (m), 921 (w), 1036 (m), 1108 (m), 1227 (s), 1365 (m), 1441 (m), 1512 (s), 1613 (m), 1705 (w), 2849 (m), 2918 (s), 3344 (s)

2-(4-Hydroxybenzyl)-4-(4-hydroxymethylphenyl)phenol (M 336)

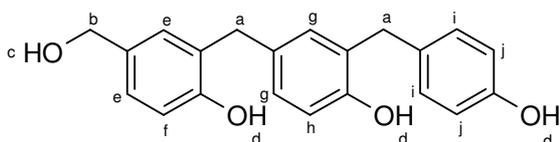
- 1 Reinheit 90 % (HPLC- UVD_{273nm})
- 2 Strukturanalytik
- 2.1 UV (Acetonitril/Wasser): 205 nm (max), 227 nm (max), 280 nm (max)
- 2.2 Elementaranalyse

C₂₁H₂₀O₄ (336,39 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	74,98	66,34
H	5,99	5,46

2.3 ¹³C-NMR500 MHz, MeOH-D₄

$\delta = 158,24$ (C-4), $\delta = 156,35$ (C-15), $\delta = 155,94$ (C-10), $\delta = 133,43$ (C-1), $\delta = 131,78$ (C 11),
 $\delta = 130,94$ (C-12), $\delta = 130,17$ (C-6), $\delta = 130,01$ (C-8), $\delta = 128,41$ (C-2), $\delta = 116,10$ (C-14),
 $\delta = 115,99$ (C-9), $\delta = 115,75$ (C-3), $\delta = 68,87$ (C-16), $\delta = 30,73$ (C-17), $\delta = 30,12$ (C-18)
 ppm

2.4 ¹H-NMR500 MHz, MeOH-D₄

$\delta = 7,17$ (H-d, i, 2H), $\delta = 7,15$ (H-e, d, 2H), $\delta = 7,11$ (H-f, d, 1H), $\delta = 7,10$ (H-h, d, 1H),
 $\delta = 6,82$ (H-g, t, 2H), $\delta = 6,76$ (H-h, d, 2H), $\delta = 4,43$ (H-b, s, 2H), $\delta = 3,97$ (H-a, s, 2H) ppm

2.5 ESI-MS

positiv, 354 (M+NH₄⁺), 359 (M+Na⁺), 375 (M+K⁺)

negativ, 335 (M-H)

M 412

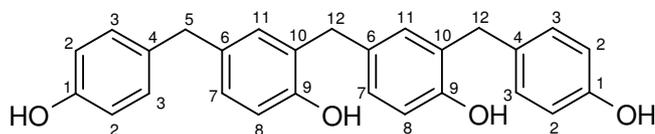
- 1 Reinheit : 95 % (HPLC- UVD_{273nm})
- 2 Strukturanalytik
- 2.1 UV (Acetonitril/Wasser): 205 nm (max), 225 nm (max), 280 nm (max)
- 2.2 Elementaranalyse

C₂₇H₂₄O₄ (412,49 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	78,62	68,33
H	5,86	5,55

2.3 ¹³C-NMR

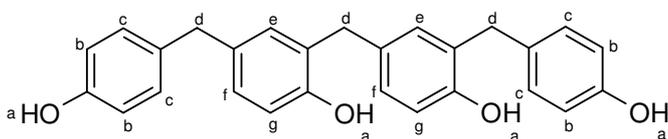
500 MHz, MeOH-D₄



$\delta = 134,42$ (C-6), $\delta = 134,24$ (C-4), $\delta = 130,80$ (C-3), $\delta = 130,66$ (C-10), $\delta = 128,40$ (C-11),
 $\delta = 128,20$ (C-7), $\delta = 116,02$ (C-8), $\delta = 50,00$ (C-2), $\delta = 115,98$ (C-2), $\delta = 36,13$ (C-5),
 $\delta = 30,12$ (C-12) ppm

2.4 ¹H-NMR

500 MHz, MeOH-D₄



$\delta = 7,03$ (H-c, m, 4H), $\delta = 6,74$ (H-f, d, 2H), $\delta = 6,73$ (H-e, d, 2H), $\delta = 6,72$ (H-b, m, 4H), $\delta = 6,71$ (H-g, m, 2H), $\delta = 3,79$ (H-d, s, 3H) ppm

2.5 ESI-MS

positiv, 430 (M+NH₄⁺), 435 (M+Na⁺), 451 (M+K⁺)

negativ, 411 (M-H)

2.6 IR

KBr, 781 (w), 819 (m), 916 (w); 1036 (m), 1109 (w), 1229 (s), 1365 (w), 1442 (m), 1512 (s),
 16134 (m), 1706 (w), 2922 (s), 3331 (s)

5.3.6 Identifizierung und Quantifizierung von Epoxidverbindungen < 1000 Da aus Coatingmigraten durch Derivatisierung mit Cysteamin

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung oxirangruppenhaltiger Verbindungen aus Coatingmigraten.

2 Begriffsbestimmung

Die Menge an migrierenden Verbindungen mit intakten Oxirangruppen und einem Molekulargewicht < 1000 Da wird nach dem hier beschriebenen Verfahren als BADGE-Äquivalente bestimmt.

3 Grundlagen des Verfahrens

Nach der Isolierung der Fraktion < 1000 Da aus Coatingmigraten mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) werden die darin enthaltenen oxirangruppenhaltigen Verbindungen mit Cysteamin im leicht basischen Milieu umgesetzt. Die erhaltenen Derivate werden danach durch Zugabe eines Kationenaustauschers aus der Probe entfernt. Nach Absetzen des Austauschermaterials wird der klare Überstand abgetrennt und mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender Fluoreszenz (FI)-Detektion bestimmt. Zur Kontrolle der vollständigen Derivatisierung wird 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether, zur Überprüfung der Fest-/Flüssigextraktion wird 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol als Interner Standard (IS) verwendet.

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Fraktion < 1000 Da vor und nach der Derivatisierung ermöglicht eine Identifizierung der Verbindungen mit intakten Oxirangruppen. Diese Verbindungen können anschließend im Chromatogramm des Gesamtmigrates angegeben als Bisphenol-A-diglycidylether- (BADGE)-Äquivalente in $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ quantifiziert werden.

4 Chemikalien

4.1 verwendete Chemikalien

- 4.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]
- 4.1.2 Ameisensäure 98 % p.a. [64-18-6]
- 4.1.3 Ammoniak 25 % p.a. [1336-21-6]
- 4.1.4 BADGE p.a. [1675-54-3]
- 4.1.5 Calciumoxid rein [1305-78-8]
- 4.1.6 Cysteamin > 98 % (RT) [60-23-1]
- 4.1.7 DMSO for UV-spectroscopy, > 98 % (GC) [67-68-5]
- 4.1.8 Ethanol abs. [64-17-5]
- 4.1.9 Kationenaustauscher DOWEX 50WX2, 200 - 400 mesh [12612-37-2]
- 4.1.10 Isopropanol rein [67-63-0]

- 4.1.11 Methanol, HPLC-grade [67-56-1]
- 4.1.12 Natriumhydroxyd (NaOH) reinst [1310-73-2]
- 4.1.13 Natriumborhydrid (NaBH_4) 95 % [16940-66-2]
- 4.1.14 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol 99 % [13595-25-0]
- 4.1.15 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether []
- 4.1.16 Salzsäure, (HCl) 37 % p.a [7647-01-0]
- 4.1.17 THF, rein [109-99-9]
- 4.1.18 Wasser, bidestilliert

- 4.2 verwendete Lösungen
 - 4.2.1 Ammoniaklösung, $c = 500 \text{ mmol/l}$
37,5 ml der 25 %igen Ammoniaklösung (4.1.3) werden auf 1000 ml mit bidest. Wasser (4.1.18) aufgefüllt
 - 4.2.2 Ammoniumformiatpuffer, 1 mM pH 3
100 ml der Ammoniaklösung (4.2.1) werden mit Ameisensäure (4.1.2) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und mit bidest. Wasser (4.1.18) auf 1000 ml aufgefüllt
 - 4.2.3 verdünnte Ameisensäure, $\sim 0,4 \text{ N}$
150 μl Ameisensäure (4.1.2) werden mit bidest. Wasser (4.1.18) auf 10 ml aufgefüllt
 - 4.2.4 verdünnte HCl, $\sim 3 \text{ N}$
33 ml HCl (4.1.16) werden mit bidest. Wasser (4.1.18) auf 100 ml aufgefüllt
 - 4.2.5 Derivatisierungsreagenz
Das Derivatisierungsreagenz ist am Tage der Verwendung frisch herzustellen.
8 mg Cysteamin (4.1.6) werden in 920 μl Wasser (4.1.18) gelöst anschließend werden 80 μl verdünnte Ameisensäure (4.2.3) und 1000 μl Ethanol (4.1.8) zugegeben; \Rightarrow pH 9, überprüfen!!
 - 4.2.6 Interne Standard-Lösungen
5 mg 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol (4.1.14) und 5 mg 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether (4.1.15) werden in 10 ml THF (4.1.17) gelöst
 \Rightarrow Stammlösung je 500 mg/l
anschließend werden 100 μl dieser Stammlösung mit THF (4.1.17) auf 10 ml aufgefüllt
 \Rightarrow verdünnte Stammlösung 5 mg/l
 - 4.2.7 BADGE-Vergleichslösungen
5 mg BADGE (4.1.4) werden in 10 ml THF (4.1.17) gelöst \Rightarrow Stammlösung je 500 mg/l
anschließend werden 100 μl dieser Stammlösung mit THF (4.1.17) auf 10 ml aufgefüllt
 \Rightarrow verdünnte Stammlösung 5 mg/l

von der verdünnten Stammlösung werden 50 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl, 800 µl bzw. 1000 µl in 5 ml Maßkolben pipettiert und mit THF (4.1.17) bis zur Marke aufgefüllt; die Konzentrationen dieser Standardlösungen betragen 50, 200, 400, 600, 800 bzw. 1000 µg/l

4.2.8 Konditionierung des Kationenaustauschermaterials DOWEX 50WX2

2 g DOWEX 50WX2 (4.1.9) werden in eine Festphasenkartusche gefüllte und mit 20 ml Methanol (4.1.11) gespült, anschließend werden 20 ml HCl (4.2.4) aufgegeben; danach wird das Austauschermaterial mit Wasser (4.1.18) neutral gewaschen; im Anschluss werden nacheinander 20 ml Acetonitril (4.1.1) und nochmals 20 ml Wasser (4.1.18) aufgegeben; anschließend wird das Material trocken gesaugt

4.3 HPLC-Eluenten

4.3.1 SEC

THF, rein (4.1.17) destilliert über NaOH (4.1.12) und NaBH₄ (4.1.13)

4.3.2 RP-HPLC

Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (4.2.2)

Eluent B: Acetonitril (4.1.1)

Eluent C: Isopropanol (4.1.10)

2h über CaO (4.1.5) unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert

5 Durchführung

5.1 Isolierung der Fraktion < 1000 Da

40 ml des nach der Methode zur Herstellung von Coatingmigraten hergestellten Migrates werden zur Trockne gebracht. Anschließend wird der Rückstand mit 500 µl THF (4.1.17) aufgenommen und zur vollständigen Lösung für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Die Trennung der Fraktionen >/< 1000 Da erfolgt an einer vorher mit Standardlösungen kalibrierten SEC-Säule. Die Fraktionen werden einzeln in geeigneten Gefäßen aufgefangen, eingeeengt und mit 5 ml THF (4.1.17) aufgenommen.

5.2 Derivatisierung mit Cysteamin und Abtrennung der Derivate

80 µl der Fraktion < 1000 Da (5.1) und 20 µl Interne Standardlösung (5 mg/l) (4.2.6) werden in ein 1,5 ml Vial pipettiert und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit 100 µl Derivatisierungsreagenz (4.2.5) aufgenommen und anschließend für 1 h bei 50 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe werden 400 µl Acetonitril (4.1.1) addiert und 100 mg Kationenaustauschermaterial (4.2.8) zugewogen. Die Probe wird 1 min kräftig geschüttelt. Nach Absetzen des Austauschermaterials wird der klare Überstand in ein zweites 1,5 ml Vial pipettiert und der HPLC zugeführt.

5.3 Aufnahme des Vergleichschromatogrammes der Fraktion < 1000 Da

80 µl der Fraktion < 1000 Da (5.1) werden in ein 1,5 ml Vial pipettiert und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 500 µl DMSO (4.1.7) aufgenommen und zur vollständigen Lösung für 15 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend direkt in die HPLC injiziert.

5.4 Aufnahme des Vergleichschromatogrammes des Gesamtmigrates

500 µl des nach der Methode zur Herstellung von Coatingmigraten hergestellten Migrates werden in ein 1,5 ml Vial pipettiert und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 500 µl DMSO (4.1.7) aufgenommen und zur vollständigen Lösung für 15 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend direkt in die HPLC injiziert.

5.5 Erstellung der Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden die unter 4.2.7 hergestellten Standardlösungen hochdruckflüssigkeitschromatographisch vermessen.

5.6 HPLC-Bedingungen

5.6.1 SEC

Stationäre Phase: SEC präp: SDV[®] 1000 Å, 5µ, 20 x 300 mm

Mobile Phase: THF (4.3.1)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 5 ml/min

Gradient:

t [min]	THF [%]
0	100
15	100

Detektion: UVD 275 nm

5.6.2 RP-HPLC

• Gesamtmigrat:

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (4.3.2)

Eluent B: Acetonitril (4.3.2)

Eluent C: Isopropanol (4.3.2)

Säulentemperatur: 30 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	70	30	0
65	5	95	0
90	5	95	0
91	0	0	100
100	0	0	100
101	70	30	0
110	70	30	0

Detektion:

FLD: Ex.: 275 nm; Em.: 305 nm

• Fraktion < 1000 Da:

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 μ , 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: Ammoniumformiatpuffer (4.3.2)

Eluent B: Acetonitril (4.3.2)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]
0	70	30
65	5	95
85	5	95
86	70	30
95	70	30

Detektion:

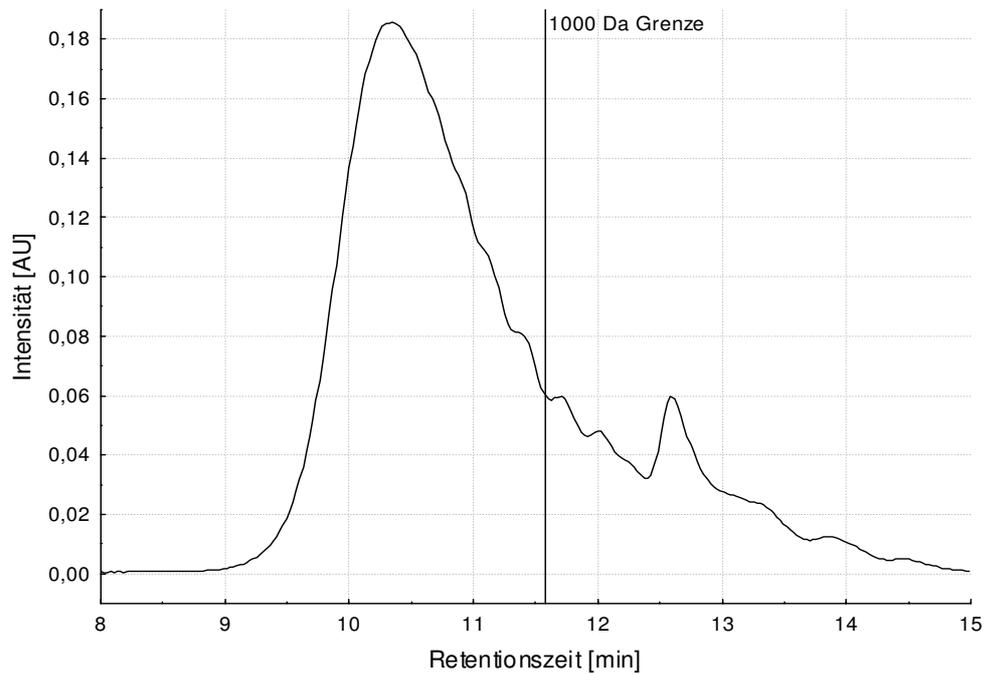
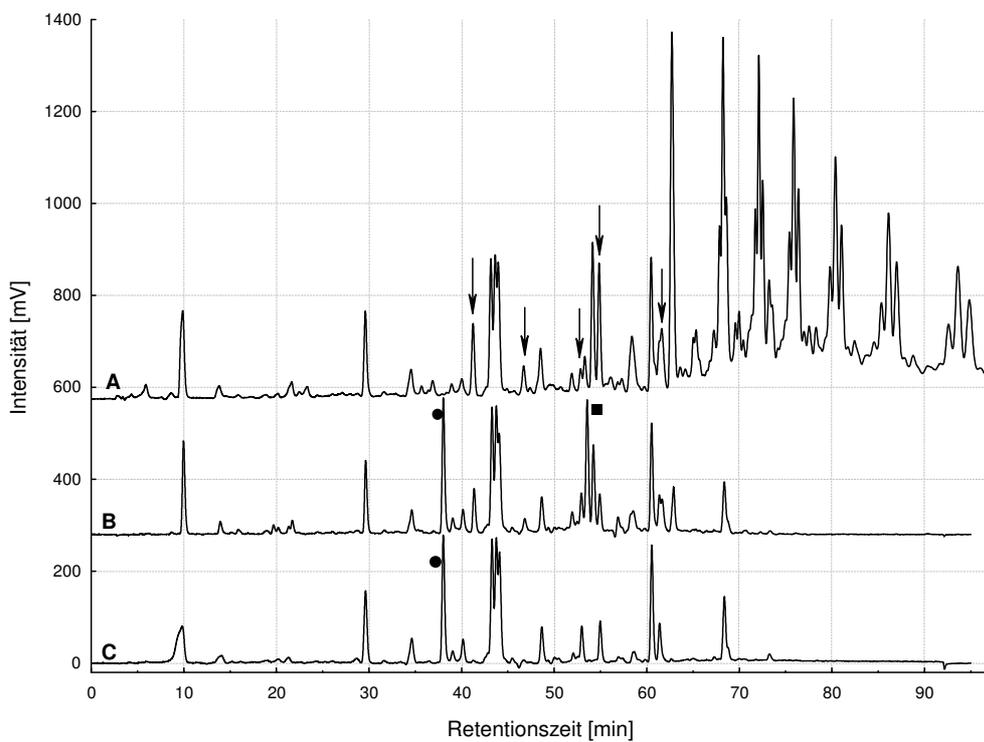
FLD Ex.: 275 nm; Em.: 305 nm

6 Auswertung

Zur Identifizierung der migrierenden oxirangruppenhaltigen Verbindungen werden die Chromatogramme der Fraktion < 1000 Da ohne Aufarbeitung mit dem der derivatisierten und extrahierten Probe verglichen. Dabei sind alle Verbindungen, welche im Chromatogramm der bearbeiteten Probe im Vergleich zur unbehandelten Fraktion nicht mehr detektierbar sind, als Substanzen mit intakten Oxirangruppen erkennbar.

Die Quantifizierung erfolgt über die Kalibrierung der BADGE-Standardlösungen (5.5) als BADGE-Äquivalente. Nach dem die qualitative Bestimmung der Phenole über den Vergleich der Chromatogramme der Fraktion < 1000 Da mit und ohne Aufarbeitung erfolgte, wird die Quantifizierung mit den Flächeneinheiten der einzelnen Substanzen aus dem Gesamtmigrat (5.4) vorgenommen. Mit Hilfe der BADGE-Kalibriergerade kann unter Berücksichtigung der zur Migration eingesetzten Fläche der Gehalt an BADGE-Äquivalenten in mg/dm^2 sowohl in Summe als auch für einzelne Verbindungen ermittelt werden.

7 Beispielchromatogramme

Abb. 5.5: Chromatogramm eines Coationmigrates, präp. SEC-UVD_{275 nm}Abb. 5.6: RP-HPLC/FLD_{275/305nm}-Chromatogramm des Gesamtmigrates (A), der Fraktion < 1000 Da mit den Internen Standards (B) (● BPM, ■ BMDGE) und der umgesetzten Probe (C), oxiranhaltige Verbindungen wurden mit einem Pfeil markiert

5.3.7 Synthese von 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether

2 Chemikalien

2.1 verwendete Chemikalien

- 2.1.1 Acetonitril HPLC-grade [75-05-8]
- 2.1.2 Calciumoxid rein [1305-78-8]
- 2.1.3 Epichlorhydrin [106-89-8]
- 2.1.4 Hexan rein [110-54-3]
- 2.1.5 Isopropanol rein [67-63-0]
- 2.1.6 Natriumhydroxyd (NaOH) reinst [1310-73-2]
- 2.1.7 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol 99 % [13595-25-0]
- 2.1.8 Toluol [108-88-3]
- 2.1.9 Wasser, bidestilliert

1.2 verwendete Lösungen

1.2.1 Natronlauge

2,1 g NaOH (2.1.5) werden mit bidest. Wasser (2.1.8) auf 10 ml aufgefüllt

1.3 HPLC-Eluenten

1.3.1 RP-HPLC

Eluent A: Wasser, bidestilliert (2.1.8)

Eluent B: Acetonitril (2.1.1)

1.3.2 präparative NP-HPLC

Hexan/Isopropanol 98:2 (v/v)

- Hexan (2.1.3) vor der Verwendung destilliert

- Isopropanol (2.1.4) wird 2 h über CaO (2.1.1) unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert

4 Durchführung

4.1 Darstellung

0,5 g (1,45 mmol) 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenol (2.1.6) werden in 2,3 ml (29 mmol) Epichlorhydrin (2.1.2) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf 80 °C erhitzt und 600 µl (3,15 mmol NaOH) Natronlauge (1.2.1) unter Rühren langsam zugegeben. Es resultiert eine milchig trübe Lösung. Nach 30 min werden nochmals 600 µl (3,15 mmol NaOH) Natronlauge (1.2.1) zugetropft. Anschließend wird noch 12 h bei RT weiter gerührt. Die Reaktion wird mittels RP-HPLC verfolgt.

4.2 Aufarbeitung

Das überschüssige Epichlorhydrin wird vorsichtig im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wird die verbleibende Probe zweimal mit je 2 ml Toluol (2.1.7) ausgeschüttelt. Die vereinigten Toluolphasen werden dreimal mit je 5 ml bidest. Wasser (2.1.8) gewaschen. Im Anschluss wird das Lösungsmittel verdampft und der farblose ölige Rückstand in 10 ml Hexan/Isopropanol 98:2 (v/v) (1.3.2) aufgenommen. Die Abtrennung des Produktes 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether von Nebenprodukten der Reaktion erfolgt über präparative NP-HPLC. Die gesammelten vereinigten Produktfraktionen werden bis zur Trockne eingeeengt. Das farblose ölige Produkt wird im Anschluss in bidest. Wasser (2.1.8) aufgeschlämmt und gefriergetrocknet.

4.3 HPLC-Bedingungen

4.3.1 RP-HPLC zur Reaktionsverfolgung

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 μ , 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: bidest. Wasser (2.1.8)

Eluent B: Acetonitril (2.1.1)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient:

t [min]	A [%]	B [%]
0	35	65
30	5	95
31	35	65
40	35	65

Detektion: UVD 275 nm

4.4 präp. NP-HPLC

Stationäre Phase: Kromasil 100 Si 7 μ , 250·20 mm, 30·20 mm Vorsäule

Mobile Phase: Hexan/Isopropanol 98:2 (v/v) (1.3.2)

Säulentemperatur: 25 °C

Fluss: 22 ml/min

Gradient:

t [min]	Hexan/Isopropanol 98:2 (v/v) [%]
0	100
25	100

Detektion: UVD 275 nm

5 Ausbeute

127 mg = 19 % ·

6 Reinheit

99 % (HPLC/UVD_{275nm})

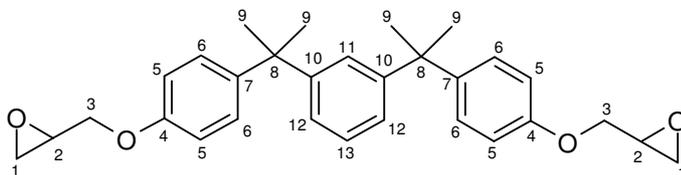
7 Strukturanalytik

7.1 UV (Acetonitril/Wasser): 224 nm (max), 272 nm (max)

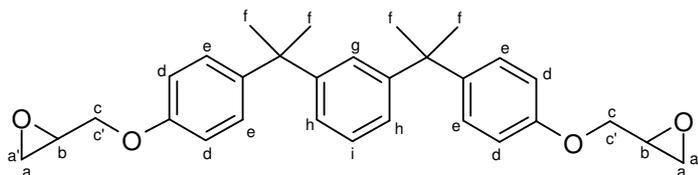
7.2 Elementaranalyse

C₃₀H₃₄O₄ (458,60 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	78,57	78,70
H	7,47	7,57

7.3 ¹³C-NMR500 MHz, DMSO-D₆

$\delta = 156,14$ (C-4), $\delta = 150,06$ (C-10), $\delta = 142,90$ (C-7), $\delta = 127,75$ (C-13), $\delta = 127,68$ (C-6), $\delta = 124,94$ (C-11), $\delta = 123,84$ (C-12), $\delta = 114,02$ (C-5), $\delta = 69,03$ (C-3), $\delta = 50,00$ (C-2), $\delta = 43,67$ (C-1), $\delta = 42,08$ (C-8), $\delta = 30,79$ (C-9) ppm

7.4 ¹H-NMR500 MHz, DMSO-D₆

$\delta = 7,13$ (H-i, dd = t, 1H), $\delta = 7,04$ (H-e, m, 4H), $\delta = 7,03$ (H-g, m, 1H), $\delta = 6,97$ (H-h, dd, 2H), $\delta = 6,81$ (H-d, m, 4H), $\delta = 4,25$ (H-c', dd, 2H), $\delta = 3,75$ (H-c, dd, 2H), $\delta = 3,29$ (H-b, m, 2H), $\delta = 2,82$ (H-a, dd = t, 2H), $\delta = 2,68$ (H-a', dd, 2H), $\delta = 1,50$ (H-f, s, 12H) ppm

7.5 ESI-MS

positiv, 476 (100, M+NH₄⁺), 481 (2, M+Na⁺), 497 (1, M+K⁺)

7.6 IR

KBr, 562 (w), 710 (m), 799 (w); 830 (m), 916 (w), 1036 (m), 1077 (w), 1186 (m), 1247 (s), 1297 (m), 1362 (w), 1384 (w), 1418 (w), 1467 (w), 1487 (w), 1510 (ss), 1608 (m), 1582 (w), 2872 (w), 2929 (w), 2967 (s), 3056 (w)

8 Reaktionsverfolgung

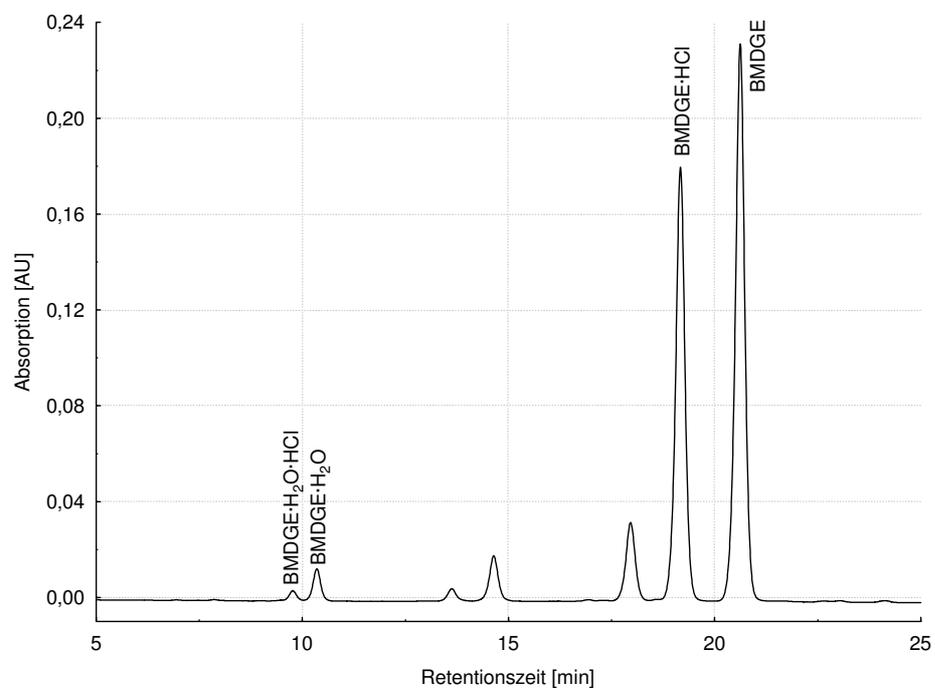


Abb. 5.7 HPLC/UVD_{275nm} – Chromatogramm, Reaktionsverfolgung zur Synthese von 4,4-(1,3-Phenyldiisopropyl)bisphenoldiglycidylether (BMDGE)

5.3.8 Identifizierung und Quantifizierung von epoxidhaltigen Verbindungen über die Derivatisierung mit 5-Dimethyl-amino-N(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin)

1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Vorschrift beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung aliphatischer Epoxidverbindungen mittels Derivatisierung mit Dansylcysteamin.

2 Begriffsbestimmung

Die Menge an aliphatischen Epoxidverbindungen wird nach dem hier beschriebenen Verfahren über ihre Derivate mit Dansylcysteamin bestimmt.

3 Grundlagen des Verfahrens

Aliphatische Epoxidverbindungen werden im basischen Milieu mit Dansylcysteamin im Überschuss umgesetzt. Anschließend wird das überschüssige Reagenz, sowie sein sich während der Reaktion gebildetes Disulfid durch Einsatz von Dithiotreithol sowie Fällung mit Silbernitrat abgetrennt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgt über die Massendifferenz vor und nach der Derivatisierung bestimmt mittels RP-HPLC/ESI-MSD. Die quantitative Bestimmung der Derivate wird mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion nach der Methode des internen Standard (IS) durchgeführt. Als IS zur Überprüfung einer vollständigen Derivatisierung wird 2,3-Epoxypropyl-phenylether verwendet.

4 Chemikalien

4.1 verwendete Chemikalien

4.1.1 Ameisensäure 98 % [64-18-6]

4.1.2 Calciumoxid rein [1305-78-8]

4.1.3 5-Dimethylamino-N-(2-mercaptoethyl)-1-naphthalinsulfonamid (Dansylcysteamin) [5354-61-0]

4.1.4 Dimethylformamid [68-12-2]

4.1.5 Dithiotreithol [3483-12-3]

4.1.6 2,3-Epoxypropyl-phenylether (Phenylglycidylether) 99 % [122-60-1]

4.1.7 Ethanol abs. [64-17-5]

4.1.8 Isopropanol, rein [67-63-0]

4.1.9 Natriumhydroxid [1310-73-2]

4.1.10 Salpetersäure 65 % [7697-37-2]

4.1.11 Silbernitrat [7761-88-8]

4.1.12 Wasser, bidestilliert

4.2 verwendete Lösungen

4.2.1 0,1 %ige Ameisensäure

1 ml Ameisensäure (4.1.1) werden mit Wasser (4.1.12) auf 1000 ml aufgefüllt.

4.2.2 Derivatisierungsreagenz

4 mg Dansylcysteamin (4.1.3) werden in 100 µl Dimethylformamid (4.1.4), 400 µl Ethanol (4.1.7), 500 µl Wasser (4.1.12) sowie 7,5 µl 1 M NaOH (4.2.6) gelöst.

4.2.3 Dithiotreithol-Lösung

100 mg Dithiotreithol (4.1.5) werden in 10 ml Ethanol (4.1.7) gelöst

4.2.4 Interne Standard-Lösung

20 mg Phenylglycidylether (4.1.6) werden in 10 ml Ethanol (4.1.7) gelöst.

4.2.5 Lösungsmittelgemisch

50 ml Dimethylformamid (4.1.4), 200 ml Ethanol (4.1.7) und 250 ml Wasser (4.1.12) werden miteinander gemischt.

4.2.6 Natriumhydroxid-Lösung

400 mg Natriumhydroxid (4.1.9) werden in 10 ml Wasser (4.1.12) gelöst.

4.2.7 Salpetersäure-Lösung

6,9 ml Salpetersäure (4.1.10) werden mit Wasser (4.1.12) auf 100 ml aufgefüllt.

4.2.8 Silbernitrat-Lösung 1%

100,7 mg Silbernitrat (4.1.11) werden in 10 ml Wasser (4.1.12) gelöst.

4.3 Kalibrierlösung

4.3.1 Derivatisierungsreagenz

Aus der Stammlösung des Derivatisierungsreagenzes (4.2.2) werden durch Verdünnen mit dem Lösungsmittelgemisch (4.2.5) Lösungen hergestellt, die einem Arbeitsbereich von 25 – 525 mg/l umfassen.

4.3.2 Interner Standard

Aus der Stammlösung des Internen Standards (4.2.4) werden durch Verdünnen mit Ethanol (4.1.7) Lösungen hergestellt, die einen Arbeitsbereich von 5 – 30 mg/l umfassen.

4.4 HPLC-Eluenten

Eluent A: 0,1 %ige Ameisensäure (4.2.1)

Eluent B: Isopropanol

2 h über CaO (4.1.2) unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert

5 Durchführung

5.1 Derivatisierung

Die Probe wird in eine Konzentration von 8 g/l, der IS in einer Konzentration von 2 g/l zusammen in Ethanol (4.1.7) gelöst. Ethanol unlösliche anorganische Bestandteile müssen vor allen weiteren Schritten durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt werden. Anschließend werden in einem 1,5 ml Vial 480 µl Derivatisierungsreagenz-Lösung (4.2.2) und 20 µl der Probelösung pipettiert. Nach kurzem Durchmischen wird der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 70 °C erhitzt. Anschließend wird die Probe unter fließendem Wasser auf RT abgekühlt. Nach Zugabe von 100 µl DTT-Lösung (4.2.3) wird weitere 5 min bei 70°C erhitzt. Nachdem die Probe erneut abgekühlt ist, werden 140 µl Salpetersäure-Lösung (4.2.7), 350 µl Dimethylformamid (4.1.4), 1160 µl Ethanol (4.1.7) und 1500 µl Wasser (4.1.12) und 250 µl Silbernitrat-Lösung (4.2.8) zugegeben. Nach kurzem Durchmischen wird die Probe 30 min bei RT stehen gelassen. Der klare Überstand wird anschließend in ein Vial überführt und chromatographiert.

5.2 Kalibrierung

Die Quantifizierung der Probebestandteile erfolgt über die Kalibrierung des Derivatisierungsreagenzes. Eine Derivatisierung erfolgt nicht.

Die Kalibrierung des Internen Standards erfolgt über das nach 4.1 erhaltene Derivat.

5.3 HPLC-Bedingungen

Stationäre Phase: Multospher 120 RP 18 HP-5 µ, 250·3 mm; 20·3 mm Vorsäule

Mobile Phase: Eluent A: 0,1 %ige Ameisensäure (4.4)

Eluent B: Isopropanol (4.4)

Säulentemperatur: 60 °C

Fluss: 0,5 ml/min

Gradient

t [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
50	40	60
51	10	90
60	10	90
61	90	10
70	90	10

Detektion: ESI-MSD

UVD 250 nm

6 Auswertung

Die Quantifizierung der UV-Messungen erfolgt über die Kalibriergerade des Derivatisierungsreagenzes sowie unter Einbeziehung der Wiederfindung des Internen Standards.

$$\text{WFR} = \frac{(y - b) \cdot 9,68}{a \cdot \text{EW}}$$

WFR...Wiederfindungsrate in %

y...Peakfläche des Derivates in mV

a...Achsenabschnitt der Kalibriergeraden von Dansylcystemin in mV

b...Steigung der Kalibriergeraden von Dansylcystemin in mV/(mg/l)

$$c = \frac{(y - b) \cdot M_S \cdot 0,2 \cdot 100}{a \cdot M_D \cdot n \cdot \text{WFR}}$$

c...Konzentration in g/l

y...Peakfläche des Derivates in mV

a...Achsenabschnitt der Kalibriergeraden von Dansylcystemin in mV

b...Steigung der Kalibriergeraden von Dansylcystemin in mV/(mg/l)

M_S ...molekulare Masse der zu bestimmenden Substanz in g/mol

M_D ...molekulare Masse der derivatisierten Substanz in g/mol

0,2...Verdünnungsfaktor

n...Zahl der Oxirangruppen der zu bestimmenden Substanz

WFR...Wiederfindungsrate des Internen Standards

5.3.9 Synthese von 5-(Dimethylamino)-N-(2-mercaptoethyl)-1 naphthalin-sulfonamid (Dansylcysteamin)

1 Chemikalien

1.1 verwendete Chemikalien

1.1.1 Aceton [67-64-1]

1.1.2 Cysteamin [60-23-1]

1.1.3 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfochlorid (Dansylchlorid) [605-65-2]

1.1.4 Dithiotreitol (DTT) [3483-12-3]

1.1.5 Ethylacetat [141-78-6]

1.1.6 Methanol [67-56-1]

1.1.7 Natriumcarbonat [497-19-8]

1.1.8 Natriumhydrogencarbonat [144-55-8]

1.1.9 Natriumsulfat [7757-82-6]

1.1.10 Wasser, bidestilliert

1.2 verwendete Lösungen

1.2.1 DTT-Lösung

5 g DTT (1.1.4) werden in 100 ml Aceton (1.1.1) gelöst

1.2.2 Natriumcarbonatlösung

es wird soviel Natriumcarbonat (1.1.7) zu 250 ml Wasser (1.1.10) gegeben bis eine gesättigte Lösung erhalten wird

1.2.3 Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 0,05 M

2,1 g Natriumhydrogencarbonat (1.1.8) werden in 500 ml Wasser (1.1.10) gelöst

2 Durchführung

2.1 Darstellung

Bei einer angestrebten Menge an Produkt von 0,5 g (1,6 mol) werden 124 mg (1,6 mol) Cysteamin (1.1.2) in 350 ml 0,05 M Natriumhydrogencarbonatlösung (1.2.3) gelöst. Außerdem werden 866 mg (3,2 mol) Dansylchlorid (1.1.3) in 150 ml Aceton (1.1.1) gelöst. Beide Lösungen werden im Wasserbad auf 37 °C temperiert und anschließend vereinigt. Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert und es werden 50 ml ebenfalls auf 37 °C temperierte DTT-Lösung (1.1.4) zugegeben. Die Reaktionslösung wird weiter 60 min inkubiert.

2.2 Aufarbeitung

Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes wird das Aceton (1.1.1) aus der Lösung entfernt. Die zurückbleibende wässrige Suspension wird zweimal mit 50 ml Ethylacetat (1.1.5) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und zweimal mit 100 ml gesättigter Natriumcarbonat-Lösung

(1.2.2) und 100 ml Wasser (1.1.10) gewaschen. Im Anschluss wird die organische Phase mit Natriumsulfat (1.1.9) getrocknet und eingengt. Der zurückbleibende ölige Rückstand wird in heißem Methanol (1.1.6) aufgenommen. Anschließend wird so lange Wasser (1.1.10) zugegeben, bis das Produkt beginnt auszukristallisieren. Alle Aufarbeitungsschritte sind möglichst unter Stickstoffatmosphäre durchzuführen.

3 Ausbeute

365 mg = 73 %

4 Reinheit

97 % (HPLC/UVD_{220nm})

5 Strukturanalytik

5.1 UV (Acetonitril/Ammoniumformiat (50 mM, pH 3)): 248 nm (max), 335 (max)

5.2 Elementaranalyse

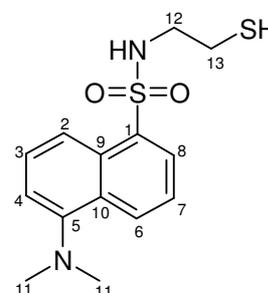
C₁₄H₁₈O₂N₂S₂ (310,5 g/mol)

Element	Soll _{berechnet} [%]	Ist [%]
C	54,17	53,54
H	5,84	5,69
N	9,02	8,92
S	20,65	19,39

5.3 ¹³C-NMR

500 MHz, MeOH-D₆

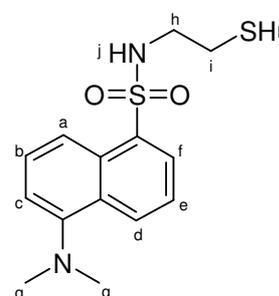
δ = 154,0 (C-5), δ = 137,8 (C-1), δ = 132,1 (C-6), δ = 131,9 (C-9), δ = 131,6 (C-10), δ = 130,9 (C-8), δ = 130,0 (C-3), δ = 125,1 (C-7), δ = 121,3 (C-2), δ = 117,3 (C-4), δ = 48,2 (C-12), δ = 46,6 (C-11), δ = 25,9 (C-13) ppm



5.4 ¹H-NMR

500 MHz, MeOH-D₄

δ = 8,64 (H-d, d, 1H), δ = 8,40 (H-a, d, 1H), δ = 8,26 (H-f, d, 1H), δ = 7,56 (H-b+e, dd, 2H), δ = 7,35 (H-c, d, 1H), δ = 3,08 (H-h, t, 2H), δ = 2,95 (H-g, s, 6H), δ = 2,71 (H-j, d, 1H), δ = 2,49 (H-i, t, 2H), δ = 2,1 (H-k, s, 1H)



5.5 ESI-MS

positiv, 311 (M+NH₄⁺), 340 (M+K⁺)

5.6 IR

KBr, 429 (w), 499 (w), 532 (w); 574 (m), 633 (m), 742 (w), 790 (s), 831 (w), 847 (m), 941 (w), 1046 (w), 1062 (w), 1077 (m), 1093 (m), 1140 (s), 1184 (w), 1203 (w), 1234 (w), 1309 (s), 1360 (w), 1408 (s), 1431 (m), 1465 (w), 1501 (w), 1579 (w), 1593 (w), 1615 (w), 2788 (w), 2829 (w), 2865 (w), 2930 (w), 3264 (m)

5.4 Analysendaten

5.4.1 Fischembryotest

Substanz	EC ₅₀ [mg/l]	Standardabweichung	log 1/EC ₅₀
Phenol (M = 94)	65	1,21	-1,81
4-HPM (M = 124)	100	-	-2
Bisphenol F (M = 200)	25	-	-1,4
Bisphenol A (M = 228)	19,9	1,09	-1,3
M 230	170	1,05	-2,2
M 306	45,7	1,2	-1,66
M 336	56,3	1,01	-1,75
Bisphenol M (M = 346)	2,05	-	-0,31
M 412	21,8	1,05	-1,34
Reaktionsmix	60	-	-1,78

5.4.2 Neutralrottest

Hep-G2

Substanz	EC ₅₀ [mg/l]	Standardabweichung	log 1/EC ₅₀
Phenol (M = 94)	> 100	-	-2
4-HPM (M = 124)	53,4	17,7	-1,73
Bisphenol F (M = 200)	23,2	5,5	-1,37
Bisphenol A (M = 228)	16,3	0,5	-1,21
M 230	66,8	6,2	-1,82
M 306	17,2	4,8	-1,24
M 336	37,3	0,8	-1,57
Bisphenol M (M = 346)	4,5	0,3	-0,65
M 412	19,4	1,7	-1,28
Reaktionsmix	25,6	1,9	-1,41

HT29

Substanz	EC ₅₀ [mg/l]	Standardabweichung	log 1/EC ₅₀
Phenol (M = 94)	> 200	-	-2,3
4-HPM (M = 124)	99,6	9,9	-2
Bisphenol F (M = 200)	58,3	5,2	-1,77
Bisphenol A (M = 228)	32,5	2,3	-1,51
M 230	90	7,9	-1,95
M 306	35,9	3,1	-1,56
M 336	61,3	1,2	-1,79
Bisphenol M (M = 346)	7,2	0,8	-0,86

M 412	36,4	2,9	-1,56
Reaktionsmix	30,7	2,4	-1,49

5.4.3 Identifizierte Verbindungen mit intakten Epoxidgruppen in den Mirgaten verschiedener kommerzieller Epoxid-Coatings

c_c ...Chromophorenkonzentration

c_s ...Substanzkonzentration

c_E ...Konzentration der Epoxidgruppen

Epoxy-Anhydrid-Coating, Migratkonzentration 5,95 dm²/l

Peak	Verbindung (Molmasse [g/mol])	area	c_c [µg/l]	c_s [µg/l]	c_s [µg/dm ²]	c_s [µmol/dm ²]	c_E [µmol/dm ²]
3	BADGE·BuEtOH (M = 458)	2083249	0,241	110,3	18,50	0,040	0,040

Organolsol-Coating, Migratkonzentration 5,87 dm²/l

Peak	Verbindung (Molmasse [g/mol])	area	c_c [µg/l]	c_s [µg/l]	c_s [µg/dm ²]	c_s [µmol/dm ²]	c_E [µmol/dm ²]
9	BADGE(n=1)·H ₂ O (M = 642)	8052904	0,956	306,9	52,28	0,081	0,081
?	als BADGE(n = 1) (M = 624)	2780701	0,324	101,28	17,25	0,028	0,056
11	BADGE(n=1)·HCl (M = 660)	2367169	2,827	933,0	158,95	0,241	0,241
8	BADGE(n=1) (M = 624)	25154645	3,005	937,51	159,71	0,226	0,512
?	als BADGE(n=2) (M = 908)	6881916	0,816	246,98	42,07	0,046	0,092
16	BADGE(n=1)·BuOH (M = 698)	3868179	0,456	158,70	27,04	0,039	0,039
27	BADGE(n=2)·HCl (M = 660)	31122208	3,720	1168,0	209,32	0,222	0,222
25	BADGE(n=2) (M = 908)	27443625	3,279	992,46	169,07	0,186	0,372
						<u>835,7</u>	<u>1,615</u>

Epoxy-Phenol-Coating 1, Migratkonzentration 6,81 dm²/l

Peak	Verbindung (Molmasse [g/mol])	area	c_c [µg/l]	c_s [µg/l]	c_s [µg/dm ²]	c_s [µmol/dm ²]	c_E [µmol/dm ²]
9	BADGE(n=1)·H ₂ O (M = 642)	3111598	0,364	116,88	18,91	0,029	0,029

5 Experimenteller Teil

17	BADGE(n=1)·EtEtOH (M = 714)	898773	0,099	35,35	5,72	0,008	0,008
8	BADGE(n=1) (M = 624)	4402572	0,517	161,86	26,12	0,042	0,084
20	BADGE(n=1)·BuEtOH (M = 742)	2381305	0,277	102,63	16,61	0,022	0,022
16	BADGE(n=1)·BuOH (M = 698)	7487302	0,888	310,02	50,16	0,072	0,072
25	BADGE(n=2) (M = 908)	10376230	1,234	373,62	60,46	0,067	0,134
30	BADGE(n=2)·BuEtOH (M = 1026)	5356251	0,633	216,50	35,03	0,034	0,034
29	BADGE(n=2)·BuOH (M = 982)	2300832	0,267	87,40	14,14	0,014	0,014
13	BADGE(n=1)·PrOH (M = 698)	3804420	0,447	138,01	22,33	0,024	0,030
26	BADGE(n=2)·H ₂ O (M = 926)	3804420	0,447	152,92	24,74	0,036	
					<u>250,7</u>	<u>0,427</u>	

Epoxy-Phenol-Coating 3, Migratkonzentration 6,54 dm²/l

Peak	Verbindung (Molmasse [g/mol])	area	c _c [µg/]	c _s [µg/l]	c _s [µg/dm ²]	c _s [µmol/dm ²]	c _E [µmol/dm ²]
?	als BADGE (M = 340)	2159706	0,250	85,03	13,00	0,038	0,076
1	BADGE (M = 340)	3612370	0,424	144,20	22,05	0,065	0,130
3	BADGE·BuEtOH (M = 458)	1816557	0,209	95,722	14,64	0,032	0,032
?	als BADGE(n=1) (M = 624)	6223800	0,737	229,94	35,16	0,056	0,112
26	BADGE(n=2)·H ₂ O (M = 926)	12273571	1,462	451,18	68,99	0,075	0,075
4	BADGE·tBuPh (M = 490)	17581849	2,098	1027,84	157,16	0,321	0,321
23	BADGE(n=1)·BPA (M = 852)	9906856	1,178	501,91	76,74	0,090	0,090
?	als BADGE(n=2) (M = 908)	12104427	1,440	436,28	66,71	0,073	0,146
25	BADGE(n=2) (M = 908)	25450576	3,040	920,20	140,70	0,155	0,310
					<u>595,2</u>	<u>1,292</u>	

Epoxy-Phenol-Coating 4, Migratkonzentration 5,99 dm²/l

Peak	Verbindung (Molmasse [g/mol])	area	c _c [µg/l]	c _s [µg/l]	c _s [µg/dm ²]	c _s [µmol/dm ²]	c _E [µmol/dm ²]
9	BADGE(n=1)·H ₂ O (M = 642)	3339924	0,391	125,70	21,00	0,033	0,033
8	BADGE(n=1) (M = 624)	1338958	0,152	47,40	7,91	0,013	0,025
26	BADGE(n=2)·H ₂ O (M = 926)	6139193	0,727	224,30	37,50	0,040	0,040
25	BADGE(n=2) (M = 908)	19502305	2,328	704,50	117,62	0,130	0,260
						<u>184,0</u>	<u>0,356</u>

5.4.4 Gehalte der einzelnen Verbindungen des TMPTGE's

Grinolit V 51 - 31

	Gehalt _{UV250nm} [%]	Gehalt _{CLND} [%]
TMPDGE	12,8 ± 0,2	11,6 ± 0,4
TMPTGE·HCl	12,2 ± 0,2	10,1 ± 0,6
TMPTGE	26,9 ± 0,5	26,1 ± 0,5
TMPTGE·ECH	18,1 ± 0,3	17,3 ± 0,5
TMPTGE·2ECH	7,0 ± 0,2	5,6 ± 0,3
Σ detektierbar	77,1 ± 1,4	70,8 ± 2,3
nicht detektierbar	22,9 ± 1,4	29,2 ± 2,3

Erisys GE-30

	Gehalt _{UV250nm} [%]	Gehalt _{CLND} [%]
TMPDGE	7,8 ± 0,4	6,4 ± 0,1
TMPTGE·HCl	11,5 ± 0,3	9,8 ± 0,1
TMPTGE	23,5 ± 0,1	22,6 ± 0,3
TMPTGE·ECH	22,8 ± 0,3	20,6 ± 0,1
TMPTGE·2ECH	10,6 ± 0,4	8,5 ± 0,8
Σ detektierbar	76,1 ± 1,5	67,8 ± 1,4
nicht detektierbar	23,9 ± 1,5	32,2 ± 1,4

5.4.5 Epoxidäquivalente bestimmt nach DIN EN ISO 3001¹¹⁶

Epoxidindex: $EI = \frac{1000}{E\ddot{A}}$ EI...Epoxidindex EÄ...Epoxidäquivalent

Rohstoff	Bezeichnung	EÄ ± SD	Hersteller- angabe EÄ	Hersteller- angabe EI	berechnetes EÄ
BPA-Harz	Araldit MY 740	192 ± 3	-	-	-
BPF-Harz	Epikote 862	169 ± 3	165 - 173	-	-
HDDGE	Polypox R 18	143 ± 3	154 ± 7	-	-
HDDGE	Bakelite EPD HD	145 ± 1	-	-	-
HDDGE	Araldit DY-H	147 ± 1	143 - 155	-	-
TMPTGE	Bakelite EPD TP	141 ± 3	146 ± 8	-	-
TMPTGE	Erisys GE-30	141 ± 3	135 - 150	-	-
TMPTGE	Grinolit V 51 - 31	135 ± 3	-	0,72 - 0,77	130 - 139
C12/C14-AGE	Araldit CY-E	306 ± 1	278 - 317	-	-
C12/C14-AGE	Polypox R 24	281 ± 2	270 - 313	-	-
C12/C14-AGE	Grinolit Epoxide 8	277 ± 1	-	0,335 - 0,37	270 - 299
C12/C14-AGE	Erisys GE-8	272 ± 1	275 - 300	-	-
C13/C15-AGE	Grinolit RV 1814	291 ± 1	-	0,320 - 0,350	286 - 313
C13/C15-AGE	Bakelite EPD ML	294 ± 1	-	-	-
PGE	Aldrich	n. b.	-	-	-
PGE	Fluka	n. b.	-	-	-
CGE	Aldrich	n. b.	-	-	-
CGE	Grinolit RV 1805	n. b.	-	0,535 - 0,570	175 - 187
PTBPGE	Erisys GE-11	n. b.	215 - 240	-	-
PTBPGE	Grinolit RV 1802	n. b.	-	0,435 - 0,460	217 - 230
PTBPGE	Polypox R 7	n. b.	220 - 240	-	-
PTBPGE	Bakelite EPD AQ	n. b.	-	-	-
BDDGE	Erisys GE-21	127 ± 1	120 - 130	-	-
BDDGE	Grinolit RV 1806	126 ± 1	-	0,76 - 0,81	123 - 132
BDDGE	Polypox R 3	135 ± 1	130 - 145	-	-
BDDGE	Bakelite EPD BD	132 ± 1	-	-	-
EHGE	Erisys GE-6	206 ± 1	205 - 235	-	-
EHGE	Polypox R 17	208 ± 1	210 - 230	-	-
EHGE	Bakelite EPD EHS	208 ± 1	-	-	-
NPGDGE	Erisys GE-20	139 ± 1	125 - 137	-	-
NPGDGE	Bakelite EPD-NE	n. b.	-	-	-
PPGDGE	Erisys GE-23	173 ± 1	175 - 205	-	-
PPGDGE	Grinolit F 704	315 ± 2	-	0,300 - 0,330	303 - 333
PPGDGE	Polypox 19	309	313 - 345	-	-
CHDMDGE	Araldit DY-C	176 ± 1	167 - 179	-	-
Produkt	Epoxidharz L	170 ± 2	-	-	-

n.b. ... nicht bestimmt; - ... keine Angabe vorhanden

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Simat angefertigt.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

Silke Wermann

Lebenslauf

persönliche Daten

Silke Wermann

geboren am 09.06.1978 in Leipzig

Ausbildung

1985 - 1992	Grund- und Mittelschule in Leipzig
1992 - 1997	39. Werner Heisenberg - Schule / Gymnasium Leipzig Abschluss: Abitur
Okt. 1997 - Sept. 2002	Studium der Lebensmittelchemie an der TU Dresden Abschluss: Diplom (1. Staatsprüfung)
Nov. 2002 - Apr. 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden, Professur für Lebensmittelchemie und Bedarfsgegenstände
Mai 2006 - Aug. 2006	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden Professur für spezielle Lebensmittelchemie und Lebensmittelproduktion
Okt. 2006 - Mai 2007	Gutachterausbildung an der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen Abschluss: 2. Staatsprüfung der Lebensmittelchemie

derzeitige Position

seit Juli 2007
Quality Specialist bei der Nestlé Deutschland AG im Nestlé Nutrition Werk Weiding