

Hexamethylendiisocyanat (HDI) und Hexamethylendiamin (HDA)

Anwendbarkeit Bestimmung in Harn

Analyt. Messprinzip Kapillargaschromatographie/Massenspektroskopie

Abgeschlossen im März 2002

Die hier beschriebene Methode erlaubt die empfindliche Bestimmung von Hexamethylendiamin (HDA) im Harn nach arbeitsplatzbedingter Exposition gegenüber Hexamethylendiisocyanat (HDI) bzw. Hexamethylendiamin.

Nach einer sauren Hydrolyse werden die Harnproben alkalisch eingestellt und mit Chlorameisensäureethylester versetzt. Dabei werden die aus dem aufgenommenen HDA sowie im HDI-Stoffwechsel entstandenen Hexamethylendiaminkonjugaten in Hexamethylendiamin überführt und zum 1,6-Bis-(ethoxycarbonylamino)-hexan (HDA-Diurethan) in einer Schotten-Baumann-Reaktion derivatisiert. Anschließend extrahiert man die Analytderivate in Cyclohexan. Das insbesondere nach massiven HDA-Expositionen unkonjugiert vorliegende HDA kann in analoger Weise in Harnproben derivatisiert werden, indem auf die saure Hydrolyse verzichtet wird. Das entstandene Hexamethylen-Diurethan wird kapillargaschromatographisch getrennt und mittels massenselektiver Detektion im SIM-Modus bestimmt. Als interner Standard dient 1,7-Heptamethylendiamin. Die Kalibrierung erfolgt mittels Vergleichsstandards, die in Urin angesetzt werden und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu untersuchenden Proben.

H

Hexamethyldiamin (HDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 3,5\%$ bzw. $1,8\%$
	Streubereich	$u = 7,8\%$ bzw. $4,0\%$
bei einer Konzentration von 10 bzw. 100 μg HDA pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,4\%$ bzw. $3,9\%$
	Streubereich	$u = 20,9\%$ bzw. $8,7\%$
bei einer Konzentration von 5 bzw. 50 μg HDA pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate	$r = 105\%$ bzw. 98%
bei einer Konzentration von 10 bzw. 100 μg HDA pro Liter Harn		
Nachweisgrenze:	2 μg HDA pro Liter Harn	

Hexamethyldiisocyanat (HDI) und Hexamethyldiamin (HDA)



1,6-Hexamethyldiisocyanat (HDI)



1,6-Hexamethyldiamin (HDA)

1,6-Hexamethyldiisocyanat (CAS-Nr. : 822-06-0, Synonyme: Lupranat H 201, Hexandiisocyanat, Diisocyanatohexan, Hexamethylen-1,6-diisocyanat, Hexamethyldiisocyanat, Desmodur H, Cardate) ist bei Raumtemperatur eine klare, farblose oder leicht gelbliche Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 255 °C. HDI ist leicht flüchtig, brennbar, wenig viskos und besitzt einen stechenden Geruch. Hexamethyldiisocyanat ist eine wichtige Ausgangschemikalie zur Herstellung von Polyisocyanaten. Es handelt sich dabei vorwiegend um das HDI-Dimer Biuret sowie das HDI-Trimer Isocyanurat. Diese Präpolymere werden eingesetzt als Härter in 2-Komponenten-Polyurethan-Lacken, die hauptsächlich im Automobilbau Anwendung finden. Weit über 90% der Produktionsmengen an HDI wird für diese Zwecke verwendet. Zum Zeitpunkt der Produktion enthält das Biuret-Präpolymer etwa 0,7% an monomerem HDI. Während der Lagerung kann aufgrund einer *in-situ*-Zersetzung der Monomeregehalt auf ca. 1,6% steigen. Der Monomeregehalt im

HDI-Trimer liegt bei ca. 0,2% und verändert sich in der Regel nicht während der Lagerung [1]. Die weltweiten HDI-Verbrauchsmengen lagen 1991 bei etwa 42 000–44 000 Tonnen [2].

Die Allgemeinbevölkerung kann gelegentlich gegenüber HDI inhalativ exponiert sein bei der Anwendung von Polyurethan-Lacken. Am Arbeitsplatz besteht die Gefahr der Aufnahme über die Atemluft oder die Haut bei der Produktion sowie der Anwendung von entsprechenden Polyurethanprodukten, wobei die Exposition bei der Verwendung von Polyurethan-Lacken am bedeutendsten ist [2].

HDI wird vor, während und nach der Resorption zum HDA hydrolysiert, das einer weiteren Biotransformation unterliegt. Nach experimentell-inhalativer Exposition von Freiwilligen gegenüber 0,025 mg/m³ über 7,5 Stunden [3] bzw. 0,005 mg/m³ über 2 Stunden [4] waren diese Produkte jedoch im Serum zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (NWG < 0,1 µg/L), wohl aber im Urin, mit dem sie mit einer Eliminationshalbwertszeit von 1,1–1,4 Stunden [3] bzw. 2,5 Stunden [4] ausgeschieden wurden. Im Mittel konnten nach inhalativer HDI-Aufnahme 11–21% [3] bzw. 39% [4] der verabreichten Dosis als HDA-Konjugate im Harn wiedergefunden werden. Als Konjugationsweg wurde vor allem die N-Acetylierung des Diamins identifiziert, nicht konjugiertes HDA war nach inhalativer Aufnahme im Harn nicht nachweisbar [4]. In einer anderen Studie, bei der 6 Freiwilligen jeweils 8,2 mg HDI oral verabreicht wurden, fand man im Harn im Mittel 0,28 mg (1–6% der Dosis) als HDA nach Hydrolyse wieder [5]. Bei oraler Aufnahme kommt zumindest noch ein weiterer Stoffwechselweg hinzu. Durch Oxidation mittels Diaminoxidasen entsteht aus HDI neben Hexamethyldiamin 6-Aminohexansäure, die ebenfalls acetyliert und ausgeschieden wird [5, 6]. Es konnten im Harn der 6 Probanden im Mittel 0,8 mg der zuvor oral verabreichten Dosis (8,2 mg) wiedergefunden werden [5, 7, 8].

In arbeitsmedizinischer Hinsicht steht die Wirkung des Hexamethylendiisocyanats auf den Respirationstrakt im Vordergrund. Durch die Reizwirkung des HDI kann es zu Beschwerden an Augen und Atemwegen kommen. Hohe Konzentrationen führen zur Abnahme der Atemfrequenz, Dyspnoe und respiratorischer Insuffizienz. Davon abzugrenzen ist eine unspezifische oder allergisch bedingte bronchiale oder alveoläre Überempfindlichkeit. Eine hautsensibilisierende Wirkung ist im Tierversuch nachweisbar. Fälle von allergischer Kontaktdermatitis werden jedoch in der Arbeitsmedizin selten beobachtet. Nach wiederholter Inhalation kommt es bei Ratten konzentrations- und zeitabhängig zu einer Schädigung der oberen und unteren Atemwege. Diese zeigt sich in der Nasenhöhle als Hyper-/Metaplasie und Ulzeration, während in der Lunge Epithalisierung, institielle Pneumonie oder Makrophagenansammlungen in den Alveolen zu beobachten sind. HDI ist im Salmonella-Mutagenitätstest mit oder ohne metabolische Aktivierung nicht mutagen. Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung der Substanz ergeben sich aus einem Langzeit-Inhalationsversuch an Ratten nicht. Mögliche Auswirkungen von HDI auf die Reproduktion sind bisher nicht untersucht [9].



Zur Belastung von Personen am Arbeitsplatz mit HDI liegen in der Literatur nur wenige Arbeiten vor. So wurden Arbeiter auf HDA-Konzentrationen im Plasma und Harn untersucht, die Umgang mit HDI-haltigen Klebstoffen hatten. Bei vermutlichen HDI-Luftkonzentrationen in Höhe von $< 0,1\text{--}0,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (die Luftmessungen fanden einige Jahre zuvor statt) konnte HDA weder im Plasma noch im Harn gefunden werden (NWG = $0,5 \mu\text{g}/\text{L}$) [10]. In einer weiteren Studie wurden 22 Arbeiter, die beim Lackieren von Karosserieteilen Umgang mit HDI-haltigen Farben hatten untersucht. Die Arbeiter trugen während dieser Tätigkeiten persönliche Schutzausrüstungen. HDA konnte im Harn von 5 der 22 Personen in Konzentrationen zwischen 1 und $12 \mu\text{g HDA}/\text{g Kreatinin}$ detektiert werden [11].

Die Kommission zur Beurteilung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft hat einen MAK-Wert festgesetzt auf $0,005 \text{ mL}/\text{m}^3$ (5 ppb) bzw. $0,035 \text{ mg}/\text{m}^3$. Dem sensibilisierenden Potential auf Atemwege und Haut wurde durch die Kennzeichnung *Sah* Rechnung getragen [9, 12].

Autoren: *J. Lewalter, G. Skarping, D. Ellrich, U. Schoen*

Prüfer: *G. Müller*

Hexamethylen-diisocyanat (HDI) und Hexamethylen-diamin (HDA)

Anwendbarkeit Bestimmung in Harn

Analyt. Messprinzip Kapillargaschromatographie/Massenspektroskopie

Abgeschlossen im März 2002

Inhaltsverzeichnis

- 1 Grundlage des Verfahrens
- 2 Geräte, Chemikalien und Lösungen
 - 2.1 Geräte
 - 2.2 Chemikalien
 - 2.3 Lösungen
 - 2.4 Interner Standard (I.S.)
 - 2.5 Vergleichsstandards
- 3 Probenahme und Probenvorbereitung
 - 3.1 Probenaufbereitung
- 4 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen
- 5 Analytische Bestimmung
- 6 Kalibrierung
- 7 Berechnung der Analysenergebnisse
- 8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung
- 9 Beurteilung des Verfahrens
 - 9.1 Präzision
 - 9.2 Richtigkeit
 - 9.3 Nachweisgrenze
 - 9.4 Störeinflüsse
- 10 Diskussion der Methode
- 11 Literatur

1 Grundlage des Verfahrens

Nach einer sauren Hydrolyse werden die Harnproben alkalisch eingestellt und mit Chlorameisensäureethylester versetzt. Dabei werden die aus dem aufgenommenen HDA sowie im HDI-Stoffwechsel entstandenen Hexamethylendiaminkonjugaten in Hexamethylendiamin überführt und zum 1,6-Bis-(ethoxycarbonylamino)-hexan (HDA-Diurethan) in einer Schotten-Baumann-Reaktion derivatisiert. Anschließend extrahiert man die Analytderivate in Cyclohexan. Das insbesondere nach massiven HDA-Expositionen unkonjugiert vorliegende HDA kann in analoger Weise in Harnproben derivatisiert werden, indem auf die saure Hydrolyse verzichtet wird. Das entstandene Hexamethylen-Diurethan wird kapillargaschromatographisch getrennt und mittels massenselektiver Detektion im SIM-Modus bestimmt. Als interner Standard dient 1,7-Heptamethylendiamin. Die Kalibrierung erfolgt mittels Vergleichsstandards, die in Urin angesetzt werden und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu untersuchenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

Kapillargaschromatograph mit massenselektivem Detektor (MSD) und automatischem Probengeber sowie einem Integrator bzw. einem PC-System zur Datenauswertung.

Trennsäule: DB-5MS (z. B. Fa. Kupfer 128-5522); Länge: 25 m, i. D.: 0,2 mm, Filmdicke: 0,33 µm

Heizblock (Trockenthermostat) der Fa. Techne – DB-BB

pH-Meter

Vortex-Multi-Schüttler (z. B. Cenco, Niederlande)

Turbovap LV (Fa. Zymark)

Dispensoren mit Einstellung von 0–5 mL

10-mL-Reagenzgläser (z. B. Schütt Labortechnik – 356 1103) mit Schraubverschlüssen und Teflondichtung (z. B. Schott)

100-mL-Messkolben

Zentrifugenröhrchen 5 mL (z. B. Sarstedt 73.705)

200-µL-konische Microvials (z. B. Macherey Nagel: 70286)

Transferringpipetten 3,5 mL (z. B. Sarstedt)

Microliterpipetten variabel einstellbar zwischen 1 und 10, 10 und 100 sowie 100 und 1000 μL (z. B. Eppendorf)

2.2 Chemikalien

1,6-Hexamethylendiamin p.a. (z. B. Aldrich; H1.169-6)

1,7-Heptamethylendiamin p.a. (z. B. Sigma; D3266)

Chlorameisensäureethylester p.a. (z. B. Merck; 800881)

37proz. Salzsäure p.a. (z. B. Merck; 1.00317.1000)

25proz. Ammoniaklösung p.a. (z. B. Fluka; 09860)

32proz. Natronlauge p.a. (z. B. Merck; 1.05587.2500)

Cyclohexan p.a. (z. B. Merck; 1.09666.1000)

Helium 99.999proz.

hochreines Wasser bzw. aqua bidest.

Ethanol p.a. (z. B. Merck)

Toluol zur Rückstandsanalyse (z. B. Merck)

2.3 Lösungen

2.4 Interner Standard (I.S.)

Stammlösung:

Ca. 10 mg Heptamethylendiamin werden in einem 100-mL-Messkolben genau eingewogen. Anschließend wird der Kolben mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt (100 mg/L).

Dotierlösung I.S.:

10 mL der Stammlösung des internen Standards werden in einem 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt (10 mg/L).

2.5 Vergleichsstandards

Stammlösung:

10 mg Hexamethyldiamin werden in einen 100-mL-Messkolben genau eingewogen. Anschließend wird der Kolben unter gelegentlichem Umschwenken mit Ethanol bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung ist im Kühlschrank mind. 2 Wochen haltbar (100 mg/L).

Arbeitslösung:

10 mL der Stammlösung werden in 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt (10 mg/L).

Vergleichsstandards:

Aus der Stammlösung und der Arbeitslösung werden Vergleichsstandards in Poolharn gemäß dem folgenden Pipettierschema hergestellt. Dazu pipettiert man die in Tabelle 1 aufgeführten Volumina der jeweiligen Lösungen in einen 50-mL-Messkolben und füllt diesen anschließend mit Poolharn bis zur Marke auf. Von diesem Material werden 2 mL Aliquote in verschließbare 5-mL-Polyethylenröhrchen pipettiert und bei ca. -18°C aufbewahrt. In dieser Weise gelagerte Vergleichsstandards sind mindestens 2 Monate haltbar.

Tab. 1: Pipettierschema zur Herstellung von Poolharn-Vergleichsstandards in 50-mL-Messkolben

Volumen der Stammlösung [μL]	Volumen der Arbeitslösung [μL]	Konzentration des Vergleichsstandards [μg/l]
–	–	0
–	25	5
–	100	20
–	250	50
100	–	200

3 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Probenahme sollte am Ende einer Arbeitsschicht erfolgen. Die Harnproben werden in Kunststoffflaschen gesammelt. Ist eine sofortige Probenaufarbeitung nicht möglich, kann der Harn bis zur Aufbereitung in der Tiefkühltruhe bei ca. -18°C mehrere Monate (bis 3 Monate geprüft) gelagert werden.

3.1 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben ggf. aufgetaut und gut durchmischt. 1 mL Harn wird in ein 10-mL-Reagenzglas mit Schraubverschluss und Teflondichtung pipettiert und mit 10 µL der Dotierlösung des internen Standards versetzt. Man pipettiert 0,5 mL 37%ige Salzsäure hinzu und inkubiert die Proben für 2 Stunden bei 100°C in einem Wasserbad. Nach dem Abkühlen werden die Proben durch vorsichtige Zugabe von 150 µL 25%iger Ammoniaklösung und 1,4 mL 32%iger Natronlauge auf einen pH-Wert > 12 eingestellt. Der pH-Wert wird mittels eines pH-Meters überprüft. Man pipettiert 2,0 mL Cyclohexan sowie 100 µL Chlorameisensäure-ethylester hinzu und schüttelt die Proben für 1 Minute intensiv unter Zuhilfenahme eines Vortexmixers. Man lässt die Probe anschließend für 1 Minute ruhen. Der Vorgang des Schüttelns und Ruhens wird insgesamt 3mal durchgeführt. In jedem Fall wird sofort nach Zugabe des Derivatisierungsreagenzes und des Cyclohexans geschüttelt. Anschließend zentrifugiert man die Probe 10 Minuten bei 3000 g zur Phasentrennung. Die obere Cyclohexanphase wird mit einer Pipette abgehoben und in ein Eindampf(Teflon)röhrchen transferiert. Darin wird die Probe in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird schließlich in 50 µL Toluol aufgenommen und in ein Microvial zur nachfolgenden Analyse überführt.

4 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	DB 5 MS
	Länge:	25 m
	Innerer Durchmesser:	0,2 mm
	Filmdicke:	0,33 µm
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 100°C isotherm für 2 min, danach Anstieg mit 10°C/min auf 280°C, 5 min bei Endtemperatur
	Injektor:	280°C
	Detektor:	300°C
Trärgas:	Helium 5.0 mit einem Fluss von 3,7 mL/min	
Split:	splitlos, split on nach 1 Minute mit 35 mL/min	
Septumspülung:	3 mL/min für 5 Minuten	

Injektionsvolumen:	1 μL
Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)
Ionisationsenergie:	70 eV
Dwell Time:	30 ms
Elektronenmultiplier:	1800–2000 V

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

Unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen ergaben sich die nachfolgend genannten Retentionszeiten für den Analyten und den internen Standard. Diese Angaben können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der GC-Säule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen.

In Abbildung 1 wird das Chromatogramm einer nativen, mit 42 μg HDA/L belasteten Harnprobe gezeigt.

5 Analytische Bestimmung

Zur gaschromatographischen Analyse wird jeweils 1 μL der aufgearbeiteten Harnproben in den GC injiziert. Liegen die Messwerte außerhalb der Kalibriergeraden, so werden die Proben mit Wasser entsprechend verdünnt und erneut aufgearbeitet.

Bei jeder Analysenserie wird eine Qualitätskontrollprobe mitanalysiert.

Die einzelnen Aminoaromaten werden über die in Tabelle 2 aufgeführten Massen quantifiziert.

Tab. 2: Retentionszeiten und zur Quantifizierung verwendete Massen

Verbindung	Retentionszeit [min]	Masse [<i>m/z</i>]
Hexamethylendiamin (als 1,6-Bis-(ethoxycarbonylamino)-hexan)	17,19	158 / 215 / 260*
Heptamethylendiamin (als 1,6-Bis-(ethoxycarbonylamino)-heptan)	18,20	229 / 274*

* Diese Massen werden zur quantitativen Auswertung herangezogen.

6 Kalibrierung

Die Vergleichsstandards werden wie die Harnproben (Abschnitt 3.1) aufbereitet und entsprechend der Abschnitte 4 und 5 gaschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert. Man erstellt eine Kalibriergerade, indem man den Quotienten der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die eingesetzten Konzentrationen aufträgt. Es ist nicht notwendig, bei jeder Analysenserie eine vollständige Kalibrierkurve aufzunehmen. Es genügt, analysentäglich einen Vergleichsstandard mitzumessen. Die Werte, die für diese Standards ermittelt wurden, setzt man dann zu demjenigen Wert ins Verhältnis, der aus der vollständigen Kalibrierkurve für diesen Standard ermittelt wurde. Mit dem bzw. den Quotienten korrigiert man jedes Messergebnis, das durch Ablesung an der Kalibrierkurve erhalten wurde.

Neue Kalibriergeraden sollten erstellt werden, wenn die Ergebnisse der Qualitätssicherung systematische Abweichungen erkennen lassen.

Die Kalibrierkurve ist zwischen den Nachweisgrenzen und 250 µg pro Liter Harn linear.

In Abbildung 2 ist eine Kalibrierfunktion von HDA in Harn dargestellt.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Mit den ermittelten Quotienten der Peakflächen des Analyten und des internen Standards geht man in die entsprechende Kalibriergerade ein und ermittelt die dazugehörige Konzentration an HDA in µg pro Liter Harn.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer [13, 14] und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren. Zur Präzisionskontrolle wird eine Harnkontrollprobe mit untersucht, die eine konstante Konzentration an Hexamethyldianilin aufweist. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu versetzt man Poolharn mit einer definierten Menge an HDA. Die Konzentrationen dieses Kontrollmaterials sollten im relevanten Konzentrationsbereich liegen. Vom Kontrollmaterial wird ein Halbjahresbedarf hergestellt, in verschleißbare 10-mL-Polyethylenröhrchen aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [15–17].



9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden Poolharn von HDA, bzw. HDI-unbelasteten Probanden mit 10 µg/L bzw. 100 µg/L dotiert und anschließend aufgearbeitet und analysiert. Bei der jeweils 10fachen Bestimmung der Harnproben ergaben sich die in Tabelle 3 dokumentierten Präzisionen in der Serie.

Tab. 3: Präzisionen in der Serie für die Bestimmung von HDA ($n = 10$)

Substanz	Konzentration [µg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
HDA	10	3,5	7,8
	100	1,8	4,0

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurde das gleiche Material wie zur Bestimmung der Präzision in der Serie eingesetzt. Diese Harne wurden an 10 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen von Tag zu Tag für HDA sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von HDA ($n = 10$)

Substanz	Konzentration [µg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
HDA	5	9,4	20,9
	50	3,9	8,7

9.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde durch Wiederfindungsversuche und durch Ringversuche geprüft. Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden wurde das gleiche Material wie zur Bestimmung der Präzision in der Serie eingesetzt und gemäß der Arbeitsvorschrift 10fach aufgearbeitet und analysiert. Zur Auswertung der Ergebnisse dienten Vergleichsstandardlösungen, die in einem anderen Harnpool angesetzt waren. Bei einer Konzentration von 10 µg/L betrug die relative Wiederfindungsrate 105%, bei der Konzentration von 100 µg/L 98%.

9.3 Nachweisgrenze

Unter den angegebenen Bedingungen der Probenaufbereitung und chromatographischen Bestimmung beträgt die Nachweisgrenze 2 µg HDA pro Liter Harn bei einem Signal-/Rauschverhältnis von mindestens 3 zu 1.

9.4 Störeinflüsse

Aufgrund der gewählten gaschromatographischen Trennung des derivatisierten Diamins und bei der GC-MSD-Auswertung eines spezifischen Fragmentions werden keine Störungen beobachtet. Sollten wider Erwarten dennoch Störungen auftreten, können die qualitative und quantitative Auswertung über mehrere Fragmentmassen des HDA-Derivates abgesichert werden.

10 Diskussion der Methode

Das hier vorgestellte Verfahren basiert auf einer von G. Skarping et al. im Jahr 1989 publizierten Analysenmethode [6]. Die Methode gestattet das Biomonitoring des aliphatischen Diamins aus Harnproben von Personen mit direktem Hexamethylendiamin-Umgang (HDA) sowie nach Umgang mit Hexamethylendiisocyanat (HDI) und dessen Verstoffwechslung zu HDA. Durch die direkte Derivatisierung des im Harn vorhandenen freien oder des nach vorheriger Hydrolyse aus seinen Konjugaten freigesetzten HDAs und anschließender Extraktion des Derivats wird die verlustreiche Direktextraktion des aliphatischen Diamins vermieden. Trotz der Änderung der Probenaufarbeitung gegenüber den Bedingungen der dieser Methode zugrunde liegenden Literaturarbeit [6] wurden vergleichbare Analysenergebnisse erhalten. Bei der gewählten Probenvorbereitung wird weniger Lösungsmittel eingesetzt. Dadurch kann ein Multischüttler verwendet werden. Damit wird die gleichzeitige Aufarbeitung vieler Proben möglich. Wegen der Lipophilie des Diurethans konnte an Stelle von Toluol mit gleichem Erfolg Cyclohexan eingesetzt werden, wodurch das Einengen der Proben entscheidend verkürzt wurde. Eine Zersetzung des HDA-Diurethans konnte während der Chromatographie auch bei hohen Temperaturen nicht beobachtet werden. Das vorgelegte Verfahren ist praktikabel und erlaubt, das gut wasserlösliche HDA reproduzierbar und hochempfindlich in bis zu 80 Harnproben pro Tag zu analysieren. Die Methode verwendet gebräuchliche Laborgeräte. Bei Einsatz eines halogenierten Derivatisierungsmittels kann die Auswertung der Analysen auch auf einem GC-ECD erfolgen.

Die Extraktion der Diamine in Form der Diurethane ermöglicht eine valide HDA-Analyse bis in den Spurenbereich. Andere Derivatisierungsverfahren wie PFPA



(Pentafluorpropan-Säureanhydrid) etc. sind ungeeignet, da sie die verlustreiche Primärextraktion des hydrophilen HDAs voraussetzen.

Verwendete Messgeräte:

Gaschromatograph Agilent 5890 mit massenselektivem Detektor Agilent 5970B, Autosampler Agilent 7673A, Datenstation Hewlett-Packard Vectra XM Serie 4; 5/133 und Auswertesoftware Agilent MSD-Chemstation

11 Literatur

- [1] *P. M. Hulse*: An evaluation of HDI in polyurethane spray paint aerosols. NTIS Nr.: AD-A151.606. (1984).
- [2] *Gesellschaft Deutscher Chemiker / Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA)*: Hexamethylen-diisocyanat. BUA-Stoffbericht 112. Verlag S. Hirzel, Stuttgart (1993).
- [3] *T. Brorson, G. Skarping und J. Nielsen*: Biological monitoring of isocyanates and related amines. II. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62, 385–389 (1990).
- [4] *H. Tinmerberg, G. Skarping, M. Dalene und L. Hagmar*: Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isophorone diisocyanate. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67(6), 367–74 (1995).
- [5] *T. Brorson, G. Skarping, J. F. Sandstrom und M. Stenberg*: Biological monitoring of isocyanates and related amines. I. Determination of 1,6-hexamethylene diamine (HDA) in hydrolysed human urine after oral administration of HDA. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62(1), 79–84 (1990).
- [6] *G. Skarping, M. Dalene, T. Brorson, J. F. Sandström, C. Sangö und A. Tiljander*: Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. *J. Chromatogr.* 479, 125–133 (1989).
- [7] *G. Skarping, M. Dalene, B.-G. Svensson, M. Littorin, B. Akesson, H. Welinder und S. Skerfving*: Biomarkers of exposure, antibodies, and respiratory symptoms in workers heating polyurethane glue. *Occup. Environ. Med.* 53, 180–187 (1996).
- [8] *M. Au, W. F. Diller, M. Heger, H.-D. Hoffmann, R. Rühl, B. Scheel und V. Wilms*: Sicherer Umgang mit isocyanathaltigen Produkten – Vorschläge zur Erfassung der Exposition und Verbesserung der Prävention. *Zbl. Arbeitsmed.* 50, 335–341 (2000).
- [9] *H. Greim* (Hrsg.): Hexamethylen-diisocyanat. Arbeitsmedizinisch-toxikologische Begründungen von MAK- und BAT-Werten. 23. Lieferung, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (1996).
- [10] *M. Littorin, L. Rylander, G. Skarping, M. Dalene, H. Welinder, U. Stromberg und S. Skerfving*: Exposure biomarkers and risk from gluing and heating of polyurethane: a cross sectional study of respiratory symptoms. *Occup. Environ. Med.* 57(6), 396–405 (2000).
- [11] *N. R. Williams, K. Jones und J. Cocker*: Biological monitoring to assess exposure from use of isocyanates in motor vehicle repair. *Occup Environ. Med.* 56(9), 598–601 (1999).
- [12] *Deutsche Forschungsgemeinschaft*: MAK- und BAT-Werte-Liste, Mitteilung 37, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2001).
- [13] *Bundesärztekammer*: Qualitätssicherung der quantitativen Bestimmungen im Laboratorium. Neue Richtlinien der Bundesärztekammer. *Dt. Ärztebl.* 85, A699–A712 (1988).

- [14] *Bundesärztekammer*: Ergänzung der „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“. Dt. Ärztebl. 91, C159–C161 (1994).
- [15] *G. Lehnert, J. Angerer* und *K. H. Schaller*: Statusbericht über die externe Qualitätssicherung arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologischer Analysen in biologischen Materialien. Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 33(1), 21-26 (1998).
- [16] *J. Angerer* und *G. Lehnert*: Anforderungen an arbeitsmedizinisch-toxikologische Analysen – Stand der Technik. Dt. Ärztebl. 37, C1753–C1760 (1997).
- [17] *J. Angerer, Th. Göen* und *G. Lehnert*: Mindestanforderungen an die Qualität von umweltmedizinisch-toxikologischen Analysen. Umweltmed. Forsch. Prax. 3, 307-312 (1998).

Autoren: *J. Lewalter, G. Skarping, D. Ellrich, U. Schoen*

Prüfer: *G. Müller*

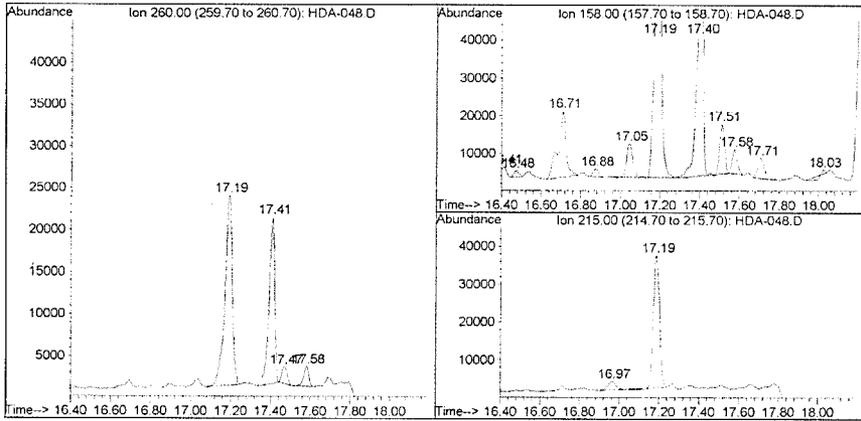


Abb. 1: Chromatogramm einer aufbereiteten Harnprobe eines am Arbeitsplatz gegenüber HDI bzw. HDA exponierten Probanden ($c = 42 \mu\text{g/L}$).

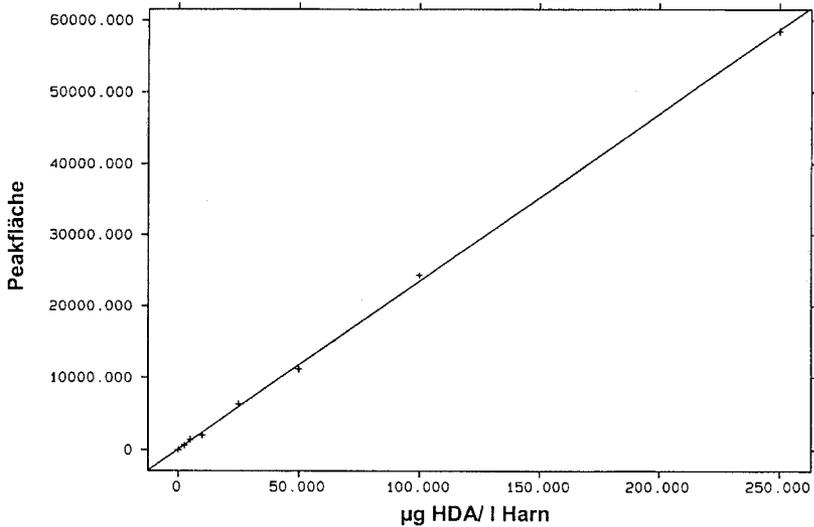


Abb. 2: Kalibrierfunktion HDA in Harn.