

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Mikroorganismen

Die ausgewählten Stämme waren bei den vorausgegangenen Arbeiten von Platzek und Lang an der Technischen Universität Berlin von der Haut gesunder Probanden isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Spaltung des Farbstoffes Direkt Blau 14 untersucht worden. Micrococen und Staphylococen sind typische Vertreter der menschlichen Hautflora^{22, 23}. Diese in Tabelle 2 aufgeführten 5 Stämme repräsentieren einen wesentlichen Anteil der physiologischen Hautflora und zeigten bei früheren Arbeiten²¹ eine relativ hohe azospaltende Aktivität.

Tab. 2 Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme

Bezeichnung	Stamm-Nr. nach VSLF*
<i>Micrococcus luteus</i>	Mi-0702
<i>Micrococcus varians</i>	Mi-0503
<i>Micrococcus roseus</i>	Mi-0401
<i>Staphylococcus aureus</i>	St-0411
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	St-0201

* Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie Berlin, zitiert nach Platzek und Lang²¹

Hinsichtlich der experimentellen Handhabung erwies sich vor allem *Micrococcus luteus* als nahezu idealer Testkeim, da er sich sicher und in hoher Dichte anzüchten ließ, bei der Zentrifugation gut abzutrennende Sedimente ergab und im Anschluss leicht zu homogenen Suspensionen verarbeitet werden konnte.

Sedimente von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* ließen sich dagegen häufig nur unter mechanischen Aufwand in Simulanz-Lösung suspendieren. Suspensionen von *Micrococcus roseus* (und zu einem gewissen Grad auch *Micrococcus varians*) ließen sich zwar zunächst mit geringem Aufwand bereiten, allerdings trat in der Suspension eine Flockung auf, die zwangsläufig zu Inhomogenitäten führte. Bei der Untersuchung von

Micrococcus roseus konnte es zudem passieren, dass dieser in der angeimpften Vorkultur kein Wachstum zeigte.

3.1.2 Verwendete Farbstoffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe

Lfd. Nr.	Bezeichnung	CAS-Nr.	C.I. Nummer	Metabolit	Wasserlöslich
1	Sudanrot G	1229-55-6	12150	o-Anisidin	Nein
2	Sudan III	85-86-9	26100	4-Aminoazobenzol	Nein
3	Crocein Scharlach MOO	5413-75-2	27290	4-Aminoazobenzol	Ja
4	Acid Orange 24	1320-07-6	20170	2,4-Xylidin	Ja
5	Acid Red 114	6459-94-5	23635	o-Tolidin	Ja
6	Bismarck Braun	5421-66-9	21010	2,4-Diaminotoluol	Ja
7	Direkt Blau 1	2610-05-1	24410	o-Dianisidin	Ja
8	Direkt Blau 14	72-57-1	23850	o-Tolidin	Ja
9	Direkt Rot 2	992-59-6	23500	o-Tolidin	Ja
10	Congorot	573-58-0	22120	Benzidin	Ja
11	Sudanrot 7 B	6368-72-5	26050	o-Toluidin	Nein
12	Scharlach R	85-83-6	26105	o-Toluidin	Nein
13	Oil Red EGN	4477-79-6	26120	o-Toluidin	Nein

Die Strukturformeln der Farbstoffe sind in Anhang A Abb. A-1 bis A-11 wiedergegeben.

Bei den hier genannten Namen handelt es sich grundsätzlich um Trivialnamen, für die noch eine Vielzahl von Synonymen existiert. Die eindeutige Bezeichnung von Farbstoffen erfolgt durch die CAS-Nummern bzw. Colour Index (C.I.) Nummern. Allein aus Gründen der

besseren Lesbarkeit werden die Farbstoffe im Folgenden mit den hier genannten Trivialnamen bezeichnet.

Die Substanzen Nr. 1 bis 4 sind gemäß Kosmetik-Verordnung zur Verwendung in äußerlich anzuwendenden Kosmetika, d.h. Zubereitungen, die nicht mit Schleimhäuten in Kontakt kommen, zugelassen⁷. Bei den übrigen Farbstoffen handelt es sich um Vertreter der Substanzen, die zur Anwendung in Bedarfsgegenständen nicht mehr zulässig sind, die aber wie unter Ziffer 1.5 geschildert, dennoch weiter auf den Verbraucher einwirken können. Sie wurden anhand einer vom SCCNFP zusammengestellten Liste¹ ausgewählt.

Die Farbstoffe wurden von Feinchemikalien-Anbietern der Sigma-Aldrich-Gruppe (incl. Fluka beschafft). Acid Orange 24 wurde von der Farbstoffsammlung der Technischen Universität Dresden zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Verwendete Amine

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Amine. Es handelt sich dabei zumeist um Spaltprodukte der in Tabelle 3 aufgeführten Azofarbstoffe:

Tab. 4 Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Amine

Stoff	CAS-Nummer
4-Aminoazobenzen	60-09-3
o-Anisidin	90-04-0
2,4-Xylidin	95-68-1
o-Toluidin	95-53-4
2,4-Diaminotoluol	95-80-7
Benzidin	92-87-5
o-Tolidin	119-93-7
o-Dianisidin	119-90-4
4,4'-Thiodianilin	139-65-1
3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1

Die Strukturformeln der Amine sind in Anhang A Abb. A-12 bis A-21 wiedergegeben.

Die Amine wurden von Sigma-Aldrich in der jeweils höchsten verfügbaren Qualität (zumeist >99%) beschafft. 3,3'-Dichlorbenzidin ist kein Metabolit von einem der hier untersuchten Farbstoffe, sondern diente als Innerer Standard bei der Festphasen-Extraktion.

Auch 4,4'-Thiodianilin kann aus keinem der hier untersuchten Farbstoffe gebildet werden. Es wurde dennoch in die Arbeiten mit einbezogen, um den evtl. Abbau und die Möglichkeiten der analytischen Wiederfindung für dieses Amin zu untersuchen.

3.1.3.1 Stamm- und Kalibrierlösungen der verwendeten Amine

Von jedem Amin wurde eine Stammlösung der Konzentration 1000 µg/ml in 0,1 M HCl bereit. Eine Ausnahme bildete das 4-Aminoazobenzol, das lediglich in einer Konzentration von 250 µg/ml löslich war. 2 ml der Stammlösung von 4-Aminoazobenzol und jeweils 1 ml aller übrigen Amine wurden in einen 10 ml Messkolben vereinigt. Die Konzentration der Amine in dieser Mischung betrug 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml für 4-Aminoazobenzol.

Eine Gebrauchslösung wurde wöchentlich frisch bereit. Dazu wurde 1 ml des o.g. Amin-Gemisches in einen 100 ml Messkolben überführt und mit Simulanz (vgl. Ziffer 3.1.4.2) aufgefüllt. Die Konzentration der Amine in dieser Lösung betrug 1 µg/ml (bzw. 0,5 µg/ml für 4-Aminoazobenzol).

Eine Kalibrierprobe wurde bereit, indem 10 ml Gebrauchslösung entnommen und mit 10 ml Simulanz und 20 ml 0,1 M HCl vereinigt wurden. Die Lösung wurde dann auf den pH-Wert von 10,0 eingestellt. Die Kalibrierprobe enthielt jeweils 10 µg aller Analyten und des Inneren Standards 3,3'-Dichlorbenzidin (Ausnahme: 5 µg 4-Aminoazobenzol) in einer Lösung, die hinsichtlich pH-Wert und Ionenstärke einer Realprobe so gut als möglich nachempfunden ist.

3.1.4 Medien zur Anzucht der Mikroorganismen

Sowohl das Flüssignährmedium zur Anzucht der Bakterien als auch die künstliche Schweiß-Lösung, im Folgenden „Simulanz“ genannt, wurden in der Publikation von Platzek und Lang²¹ beschrieben.

3.1.4.1 Flüssignährmedium

Das Flüssignährmedium entspricht dem Standard-Nährmedium I, ergänzt um einen 1%igen Zusatz von Natriumchlorid. Nach den Erfahrungen des Institutes für Mikrobiologie und Genetik hat dieser Zusatz günstige Auswirkungen auf das Wachstum von Hautbakterien.

3.1.4.2 Künstliche Schweiß-Lösung (Simulanz)

- 0,5 g L-Histidin-Monohydrochlorid-1-hydrat
- 5,0 g Natriumchlorid
- 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat
- gelöst in 1 Liter destilliertem Wasser
- eingestellt auf pH-Wert 6,8

3.1.5 Sonstige Chemikalien

- HCl, Ampullen zur Bereitung einer 0,1 M Lösung
- Natriumdithionit
- Methanol, hochrein für Flüssigkeitschromatographie (LiChroSolv)
- Stickstoff

3.1.6 Verwendete Geräte

- Zentrifugen Sorvall RC 5C und Biofuge primo R
- Schüttelmaschine
- Kolben zur Anzucht
- Erlenmeyer-Kolben zur Inkubation
- Vials mit Schraubverschluss und Septum, 40 ml für SPME
- Festphasen-Extraktionsgerät Vac Master 10
- HPLC 1090 von Agilent Technologies (ehem. Hewlett-Packard)
- Säule: LiChroSpher 60 RP-Select B, Korngröße 5 µm, 125 · 4 mm
- Software ChemStation Version A 07.01, Agilent Technologies
- Vollpipetten und Messpipetten verschiedener Größe
- Kolbenhubpipetten 100 µl bis 1000 µl

3.2 Anzucht der Mikroorganismen

Die Anzucht der Mikroorganismen folgte den in der Publikation von Platzek und Lang²¹ genannten Schritten und wurde von Frau Birgit Baumann (Technische Universität Berlin) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde eine Vorkultur des gewünschten Stamms in 20 ml Flüssignährmedium angeimpft und für einen Zeitraum von 72 Stunden unter reziproker Schüttlung (120 Hübe/min) bei 28 °C inkubiert. Bei reziproker Schüttlung erfolgen die

Bewegungen nach links und rechts nur entlang einer einzelnen Längsachse, dieses Verfahren eignet sich am besten, um Effekte wie Sedimentation oder Zentrifugation auszuschließen und eine homogene Verteilung der Bakterien in der Lösung über den gesamten Zeitraum sicherzustellen.

Die Bedingungen hinsichtlich Schüttelung und Temperatur wurden auch bei allen folgenden Inkubationen angewendet.

Jeweils 1 ml der Vorkultur wurde auf 130 ml Flüssignährmedium überimpft. Die so erhaltenen Hauptkulturen wurden für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Hauptkulturen mikroskopisch auf Reinheit kontrolliert.

3.3 Bereitung der Assays und Inkubation

Auch die in diesem Abschnitt wiedergegebenen Arbeitsschritte entsprechen im Wesentlichen den Vorgaben des Artikels von Platzek und Lang²¹. Allerdings wurden unterschiedliche Gefäße für die Durchführung der Inkubation erprobt und schließlich eine optimierte Vorgehensweise gefunden.

3.3.1 Optimiertes Verfahren

Jeweils 2 Hauptkulturen wurden in einem 500 ml Zentrifugenbecher vereinigt. Die Bakterien wurden durch 10minütige Zentrifugation (verwendete Zentrifuge: Sorvall RC 5C) bei 6000 Umdrehungen je Minute geerntet. Das Nährmedium wurde abdekantiert. Jedem Zentrifugengefäß wurden 40 ml Schweiß-Simulanz zugesetzt und die Bakterien darin resuspendiert. Abweichend zu einer früher angewandten Arbeitsweise wurden alle Suspensionen eines in einem Arbeitsgang angezüchteten Stamms in einem Erlenmeyer-Kolben vereinigt. Dieser Kolben wurde vor jeder Entnahme von Keimsuspension 10 Mal von Hand geschüttelt (reziproke Schüttlung, d.h. einfache Links-Rechts-Bewegung), um die Suspension homogen zu halten und in den Assays gleichförmige Keimzahlen zu erzielen.

Jeweils 10 ml einer Keimsuspension wurden in ein geeignetes Gefäß (siehe folgender Absatz) pipettiert, es wurden Farbstoffe bzw. Farbstoff-Lösungen zugesetzt und falls erforderlich, das Volumen des Assays durch Zugabe von Simulanz auf 20 ml angeglichen.

Inkubationen wurden entweder unter aeroben oder anaeroben Bedingungen durchgeführt.

Inkubationen unter aeroben Bedingungen wurden in einen Erlenmeyerkolben mit Capotest-Verschluss durchgeführt. Dieser Verschluss ist dazu geeignet, den Inhalt eines Kolbens zuverlässig vor Kontamination durch feste Partikel, einschließlich fremder Mikroorganismen und durch Flüssigkeiten zu schützen, andererseits aber den freien Gasaustausch mit der Umgebung zuzulassen.

Inkubationen unter anaeroben Bedingungen wurden (nach Erprobung anderer Gefäße) in Erlenmeyerkolben mit Enghals und Normschliff-Stopfen durchgeführt. Der in der Flüssigkeit und der darüber befindlichen Gasphase befindliche Sauerstoff wurde durch 1 min Spülung mit Stickstoff vertrieben. Der Stickstoff wurde dabei durch eine aus Glas gefertigte Pipette eingeleitet. Unmittelbar danach wurde das Gefäß mit einem Normschliff-Stopfen verschlossen.

Bei unlöslichen Farbstoffen wurde eine leicht abgewandelte Arbeitsweise angewandt. Zunächst wurde die Keimsuspension, aufgefüllt mit Simulanz auf 20 ml für 1 min mit Stickstoff durchspült, um Sauerstoff sowohl aus der Lösung als auch aus dem Dampfraum zu entfernen. Unmittelbar danach wurde der auf einem Wägeschiffchen ausgewogene Farbstoff hinzu gegeben. Anschließend wurde der Dampfraum, nicht aber die Lösung nochmals 30 Sekunden mit Stickstoff gespült, um etwa erneut hinzugetretenen Sauerstoff zu entfernen, der Kolben wurde danach sofort mit dem Normschliff-Stopfen verschlossen. Diese Vorgehensweise war notwendig, da ungelöster Farbstoff sonst in nicht definierbaren Mengen an der Pipette und der Wand des Kolbens haften bleibt, was zu nicht reproduzierbaren Mengen an Substrat im Assay und entsprechend verfälschten Ergebnissen führen würde.

3.3.2 Weitere hier erprobte Vorgehensweisen

Neben den beschriebenen Kolben wurden im Verlauf der Versuche weitere Gefäße für die Durchführung der Inkubation erprobt. So wurden anfangs 40 ml Vials mit Schraubverschluss der Fa. Supelco eingesetzt, ohne dabei den Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen. Die Ergebnisse und ihre Bewertung sind unter Ziffer 4.2.4.6 wiedergegeben. Die dort diskutierten Schlussfolgerungen führten zum Austausch der Vials mit Schraubverschluss zunächst gegen Reagenzgläser und schließlich gegen Kolben mit Normschliff-Stopfen.

Als nachteilig erwies sich, dass der Schraubverschluss der Vials, vor allem bei deren erneuter Verwendung, den Gastaustausch mit der Umgebung nicht vollständig blockierte. Bereits Spuren von Sauerstoff, die auf diese Weise in den Assay gelangten, konnten so zu

abweichenden Ergebnissen in Bezug auf das im Assay nachgewiesene Amin führen (vgl. Ziffer 4.2.4.6).

Der Austausch der Vials mit Schraubverschluss gegen Reagenzgläser mit Normschliff-Stopfen führte bereits zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit, vgl. hierzu unter Ziffer 4.4.3 die Ergebnisse aus KW 05/03. Allerdings kam es trotz reziproker Schüttlung mit 120 Hüben pro Minute in den engen Reagenzgläsern zu einer Sedimentation der Mikroorganismen. Da sich durch Sedimentation die Lebensbedingungen der Mikroorganismen in einer unkontrollierten Weise ändern und nicht kalkulierbare Auswirkungen auf den Stoffwechsel und den Verlauf der Azospaltung haben könnten, musste ein alternatives Gefäß gefunden werden, bei dem eine Sedimentation der Bakterien vermieden werden konnte. Als geeignet erwiesen sich letztlich die beschriebenen Erlenmeyer-Kolben mit Normschliff-Verschluss. Da der Dampfraum und damit der Anteil des im Kolben ursprünglich noch vorhandenen Sauerstoffs jedoch ungleich größer war als bei zuvor verwendeten kleineren Gefäßen, musste der Sauerstoff durch Stickstoffspülung entfernt werden. Die mit diesem optimierten Verfahren erhaltenen Messwerte machen den Großteil der in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse aus.

3.4 Inkubation

Die Inkubation der Assays erfolgte in einem auf 28 °C thermostatierten Brutraum unter reziproker Schüttlung (d.h. entlang einer einzigen Achse) mit 120 Hüben pro Minute. Diese Bedingungen erwiesen sich als geeignet, um für die gesamte Dauer des Versuchs eine Sedimentation der Mikroorganismen zu vermeiden.

Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Inkubationen für die Dauer von 24 Stunden durchgeführt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Inkubation durch Kühlung der Assays im Eisbad beendet.

3.5 Gewinnung der Probenlösung

Der gesamte Ansatz wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und 10 min lang bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (verwendete Zentrifuge: Biofuge primo R, Fa. Heraeus). Anschließend wurde die überstehende Lösung dekantiert.

Diese Lösung enthält bereits einen Großteil der während der Inkubation freigesetzten Amine. Um jedoch auch die Restmengen von evtl. an die Zellwand der Bakterien adsorbierten Amine

zu erfassen, wurden die sedimentierten Zellen durch erneutes Suspensieren in 0,1 M HCl gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation (6000 Umdrehungen pro Minute, Biofuge primo R, 10 Minuten) wurde die überstehende saure Lösung dekantiert und mit der ursprünglichen Probenlösung vereinigt.

3.6 Lagerung und Aufbereitung der Probenlösung

Die gewonnenen Probenlösungen wurden grundsätzlich zum frühestmöglichen Zeitpunkt aufgearbeitet, aus organisatorischen Gründen ließ sich jedoch eine Lagerung für etwa 72 Stunden (d.h. über das Wochenende) nicht vermeiden. Die Proben wurden im Kühlschrank (Temperatur 6 °C) gelagert. Dadurch und bedingt durch die Tatsache, dass die Amine im sauren Milieu, d.h. in ihrer protonierten Form vorlagen, kann ein Abbau der Amine über diesen Zeitraum praktisch ausgeschlossen werden.

Um eine Störung der Festphasen-Extraktion durch evtl. in der Probe enthaltene Fragmente von Zellen zu vermeiden, wurden die Proben über ein Polycarbonat-Filter, Porengröße 0,65 µm, gegeben. Ein Großteil des in der Probe noch vorhandenen Farbstoffs blieb ebenfalls auf dem Filter zurück und wurde dadurch als evtl. die Festphasen-Extraktion störender Matrix-Einfluss ausgeschaltet.

3.7 Festphasen-Extraktion

3.7.1 Standard-Verfahren

Allen Probenlösungen wurde 1 ml Innerer Standard (3,3-Dichlorbenzidin in 0,1 M HCl, $c = 10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt, anschließend wurde ein pH-Wert von 10,0 eingestellt. Außerdem wurde eine Kalibrierprobe (Zusammensetzung siehe Ziffer 3.1.3.1) aufbereitet.

Die Festphasen-Extraktion nach dem Standard-Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

- Kartusche: Discovery DSC-18 Supelco
- Sorbensmasse: 500 mg
- Konditionierung: 6 ml Methanol
6 ml Simulanz-Lösung, pH 10,0
- Aufgabe der Probenlösung

- Trockensaugen des Sorbens, max. 5 Sekunden
- Elution mit 0,5 + 1,0 + 0,5 ml Methanol

Bei dem verwendeten Sorbens handelt es sich um ein konventionelles Material zur Umkehrphasen-Extraktion, ein mit C 18-Ketten derivatisiertes Kieselgel.

Die Konditionierung entspricht dem Standard-Verfahren für Festphasen-Extraktionen: zunächst wird Methanol aufgegeben, das den späteren Kontakt zwischen der hydrophoben Festphase und der wässrigen Lösung vermitteln soll. Die zweite Konditionierungslösung entspricht hinsichtlich ihrer Ionenstärke und des pH-Werts der anschließend aufgegebenen Probenlösung. Während der Konditionierung ist unbedingt darauf zu achten, dass die Sorbentien stets mit Flüssigkeit bedeckt sind, d.h. nicht „trocken laufen“. Daher werden die Konditionierungslösungen ohne Anwendung von Vakuum und nur mit Hilfe der Schwerkraft aufgegeben.

Auch die anschließende Aufgabe der Probenlösung erfolgt in der Regel nur im Schwerkraft-Gradienten. Erst wenn ein bis zwei Säulen eines Arbeitsgangs deutlich mehr Zeit bis zur Passage der Lösungen benötigen, kann der Vorgang durch Anlegen eines leichten Unterdrucks beschleunigt werden. Dabei sollte die Tropfgeschwindigkeit jedoch 1 bis 2 Tropfen je Sekunde nicht überschreiten.

Das Trockensaugen erfolgt mit verhältnismäßig starkem Unterdruck, jedoch nur für einige Sekunden. Auf diese Weise werden Reste der wässrigen Probenlösung vom Sorbens entfernt, die sich ansonsten mit dem Elutionsmittel Methanol mischen, seine Elutionskraft mindern und evtl. zu unvollständiger Desorption der Analyten führen könnte. Die Beschränkung auf wenige Sekunden soll Verluste der z.T. leichtflüchtigen Analyten vermeiden.

Potentiell wichtigste Fehlerquelle bei der Festphasen-Extraktion ist jedoch eine zu schnelle Passage des Elutionsmittels. Die Anwendung eines leichten Unterdrucks ist hier erforderlich, allerdings sollen auch hier nur etwa 1 – 2 Tropfen Methanol pro Sekunde aus der Kartusche treten. Durch die Aufgabe des Elutionsmittels in drei Schritten wird diese Fehlerquelle jedoch in aller Regel vermieden.

Die aufgefangenen Eluate wiesen eine ausreichend hohe Konzentration an Analyten und Innerem Standard auf, um ohne vorherige Einengung mittels HPLC untersucht zu werden. Auf diese Weise wird nicht nur Zeit gespart, es werden auch Verluste an leichtflüchtigen Analyten vermieden.

Die beschriebene Methode eignet sich für alle Analyten und ist mit verhältnismäßig geringem Zeit- und Materialaufwand durchführbar. Durch die relativ große Sorbensmasse von 500 mg ist die Methode robust gegenüber störenden Matrixeinflüssen, d.h. auch wenn ein Teil des Sorbens durch biogene Moleküle oder überschüssigen Farbstoff belegt wird, steht noch genügend freies Sorbens zur Verfügung, um die Extraktion mit reproduzierbaren Ergebnissen abzuschließen.

Eine Aufreinigung, d.h. eine Entfernung störender Matrix-Einflüsse erfolgt bei dieser Methode nicht, ist in den meisten Fällen aber auch nicht notwendig. Einziger Nachteil der Methode ist das relativ große Elutionsvolumen von 2 ml, so dass im Bereich unterhalb von 1 µg die Peaks der Amine recht klein und schlecht auszuwerten sind. Bei den meisten Versuchen wurden jedoch Amin-Konzentrationen im Assay erreicht, die sich mit dem beschriebenen Verfahren sauber quantifizieren lassen.

Sofern bei einzelnen Messreihen nichts anderes angegeben ist, wurde die Extraktion nach dem Standard-Verfahren durchgeführt.

3.7.2 Ergänzender Schritt: Saure Aufreinigung

Zur Bestimmung bestimmter Analyten in sehr niedrigen Konzentrationen wurde folgendes alternatives Verfahren erprobt und eingesetzt:

Realproben und Kalibrierprobe wurden auf einen pH-Wert von 1,0 eingestellt. Innerer Standard wurde nicht zugesetzt.

DSC-18-Kartuschen wurden mit 6 ml Methanol und 6 ml 0,1 M HCl konditioniert, die Proben wurden aufgegeben, diesmal aber wurden die Permeate aufgefangen. Die Sorbentien wurde mit 10 ml 0,1 M HCl gewaschen, die jeweils mit dem ursprünglichen Permeat vereinigt wurde. Anschließend wurden die Kartuschen verworfen.

Bei einem pH-Wert von 1,0 werden die basischen Amine protoniert und damit in polare Verbindungen überführt, die von der Umkehrphase des Sorbens nicht zurückgehalten werden. Dagegen verbleiben nicht-basische organische Stoffe, z.B. matrixbedingte Verunreinigungen in ihrer Neutralform und werden als unpolare Verbindungen auf der Kartusche adsorbiert und somit aus der Lösung entfernt.

Den Permeaten wurde jeweils 1,0 ml Innerer Standard zugesetzt (3,3'-Dichlorbenzidin in 0,1 M HCl, $c = 10 \mu\text{g/ml}$). Anschließend wurden sie auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt und wie unter Ziffer 3.7.1 beschrieben extrahiert.

3.7.3 Alternative Probenaufbereitung am Kationenaustauscher

Die Kalibrierprobe enthält abweichend von den zuvor geschilderten Methoden jeweils $1 \mu\text{g}$ jedes Amins. Den Realproben und der Kalibrierprobe wird jeweils 1,0 ml Innerer Standard zugesetzt (3,3'-Dichlorbenzidin in 0,1 M HCl, $c = 10 \mu\text{g/ml}$). Alle Proben werden bei einem pH-Wert von 1,0 aufgegeben und wie folgt extrahiert:

- Kartusche: Oasis MCX
- Sorbensmasse: 15 mg
- Konditionierung: 1 ml Methanol
1 ml Simulanz-Lösung, pH 1,0
- Aufgabe der Probenlösung
- Waschen mit 2,0 ml 0,1 M HCl
- Waschen mit 2,0 ml 0,1 M Methanol
- Trockensaugen des Sorbens, max. 5 Sekunden
- Elution mit 0,25 + 0,25 ml Elutionslösung (5% Triethylamin in Methanol)

Bei dem verwendeten Sorbens handelt es sich um ein polymeres Material, das aufgrund seiner funktionellen Gruppen sowohl die Eigenschaften eines Kationenaustauschers als auch einer Umkehrphase besitzt.

In einer Lösung mit pH 1,0 liegen die Amine in ihrer protonierten Form vor und werden daher an den Kationen-Austauscherguppen des Sorbens gebunden. Die anschließende Waschung mit 0,1 M HCl entfernt hydrophile, nicht-basische Verunreinigungen, anschließend werden nicht-basische lipophile Verunreinigungen mit 2 ml Methanol entfernt.

Die Elution erfolgt mit einer Lösung von 5% Triethylamin in Methanol. Durch die organische Base werden die Amine deprotoniert und in ihre Neutralform überführt, die nicht länger am Kationenaustauscher gebunden ist und durch das organische Lösungsmittel eluiert.

3.8 Chromatographische Methoden

Für Nachweis und Quantifizierung der Amine in den durch Festphasen-Extraktion gewonnenen Eluaten wurde eine (leicht abgewandelte) HPLC-Methode aus der Amtlichen Sammlung von Prüfverfahren²⁴ verwendet. Die Parameter sind im Folgenden wiedergegeben:

- Säule: LiChroSpher 60 RP-Select B, Korngröße 5 µm, 125 * 4 mm
- Temperatur 40 °C
- Injektionsvolumen: 15 µl
- Eluent 1: Ammoniumacetat-Puffer, 10 mmol/l, pH 6,9
- Eluent 2: Methanol für Flüssigkeits-Chromatographie (LiChroSolv® von Merck)
- Gradient:
 - Startbedingungen: Puffer 85%, Methanol 15%
 - Anteil des Methanols in 45 min linear auf 80% erhöht
 - 10 min Elution mit 80% Methanol zur Entfernung lipophiler Verunreinigungen
 - 5 min Spülung mit Laufmittelgemisch unter Startbedingungen vor Einspritzung der nächsten Probe
- Detektion am Diodenarray-Detektor (DAD), Quantifizierung bei 240 nm, 280 nm und 305 nm

Bei der hier angewandten Vorschrift handelt es sich um eine Umkehrphasen-Methode. Je unpolarer eine Verbindung ist, desto länger bzw. häufiger wird sie an der stationären Phase zurückgehalten und desto höher ist der Methanol-Anteil, der zur Elution benötigt wird. Somit geben die Retentionszeiten, beispielhaft wiedergegeben in Tabelle 5 zugleich einen Anhaltspunkt bzgl. der Polarität der einzelnen Analyten.

Einzige Abwandlung gegenüber dem in der Amtlichen Sammlung²⁴ angegeben Verfahren ist der Austausch des Natriumdihydrogenphosphat-Puffers gegen eine Ammoniumacetat-Lösung, pH 6,9. Diese Pufferlösung reicht zur Absicherung eines stabilen pH-Wertes vollkommen aus, neigt aber im Gegensatz zum Phosphat-Puffer nicht zur Bildung schwer löslicher Ablagerungen innerhalb des empfindlichen Chromatographen.

Die in der Tabelle wiedergegeben Retentionszeiten sind nur Richtwerte. Im Laufe der Alterung einer Umkehrphasen-Säule kommt es zu einer langsamen Hydrolyse der gebundenen unpolaren Gruppen und damit zu einer Verminderung der theoretischen Böden, einer Verkürzung der Retentionszeit und einer Minderung der Trennleistung. Jedoch vollzieht sich dieser Prozess schleichend. Durch die stetige Mitführung von Kalibrierproben können die

Peaks jeweils exakt einem Analyten zugeordnet werden. Erst wenn eine Überlappung von Analyten-Peaks untereinander oder mit matrixbedingten Peaks zu befürchten ist, muss die Säule ausgetauscht werden.

Die Analyten wurden anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert und aufgrund der Flächeninhalte des Peaks (relativ zur Fläche des Inneren Standards) quantifiziert.

Grundsätzlich wurden die Analyten bei der Wellenlänge quantifiziert, bei der sie ihre intensivste Absorption aufweisen. Davon abweichend wurden o-Dianisidin und bei einigen Proben auch der Innere Standard 3,3'-Dichlorbenzidin bei 305 nm statt 280 nm quantifiziert. Die Absorption bei auf dieser Wellenlänge zwar geringfügig niedriger, jedoch war hier eine bessere (vollständige) Trennung von z.T. auftretenden Nachbar-Peaks möglich.

Tab. 5 Analyten, Retentionszeiten und Wellenlänge der Quantifizierung

Analyt	Retentionszeit	Wellenlänge zur Quantifizierung
2,4-Diaminotoluol	10,3 min	240 nm
o-Anisidin	20,7 min	240 nm
o-Toluidin	21,9 min	240 nm
Benzidin	25,2 min	280 nm
2,4-Xylidin	29,7 min	240 nm
4,4'-Thiodianilin	30,2 min	240 nm
o-Dianisidin	31,1 min	305 nm
o-Tolidin	33,5 min	280 nm
4-Aminoazobenzen	39,9 min	240 nm
3,3'-Dichlorbenzidin (IS)	41,3 min	280 nm/ 305 nm

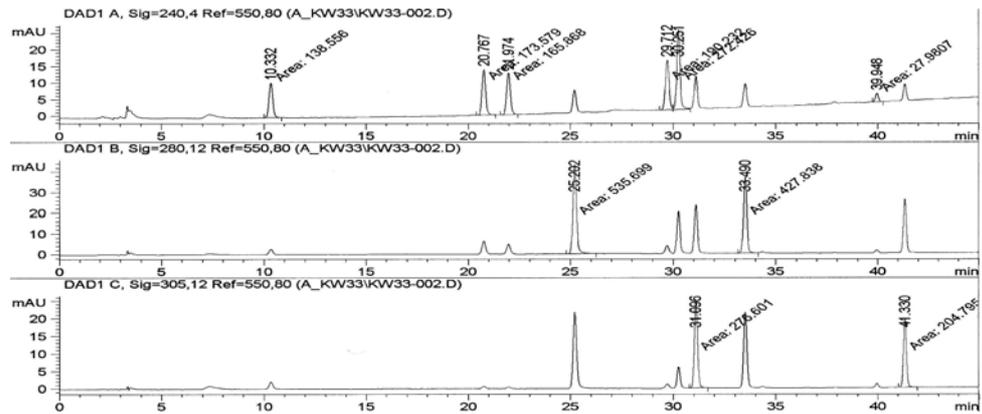


Abb. 2 Referenz-Chromatogramm

Abbildung 2 zeigt ein Chromatogramm einer Kalibrierprobe, wie es bei der Aufarbeitung einer unter Ziffer 3.1.3.1 beschriebenen Lösung erhalten wurde. Die Peaks der Analyten sind deutlich von einander getrennt und gleichzeitig ausreichend intensiv, um sicher quantifiziert werden zu können.

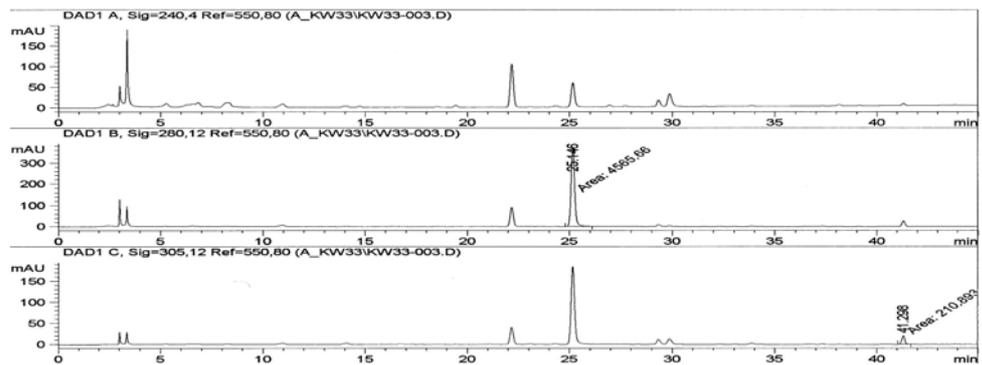


Abb. 3 Chromatogramm einer Realprobe

Abbildung 3 zeigt ein Chromatogramm einer Realprobe, wie es nach Inkubation des Farbstoffs Congorot und anschließender analytischer Aufarbeitung beobachtet wurde. Deutlich erkennbar ist der intensive Peak des Analyten Benzidin, der bei einer Wellenlänge von 280 nm quantifiziert wird. Die Fläche des Peaks des Inneren Standards 3,3'-Dichlorbenzidin, (Retentionszeit 41 min) ist vergleichbar mit dem Peak der Realprobe (vgl. Abb. 2) und erscheint nur im Verhältnis zum Peak des Benzidins als sehr klein.

3.9 Auswertung: Berechnung der Menge des freigesetzten Amins

Zur Berechnung der Menge des in der Probenlösung enthaltenen Amins werden die Peak-Flächen des Analyten und des Inneren Standards in Kalibrier- und Realprobe herangezogen. Die Masse des in der Probenlösung enthaltenen Amins errechnet sich dann wie folgt:

$$m_{\text{Amin-Probe}} = \frac{A_{\text{Amin-Probe}} \cdot A_{\text{IS-Kalib}}}{A_{\text{IS-Probe}} \cdot A_{\text{Amin-Kalib}}} \cdot m_{\text{Amin-Kalib}}$$

$m_{\text{Amin-Probe}}$	Masse des Amins in der Realprobe
$A_{\text{Amin-Probe}}$	Peak-Fläche des Amins im Chromatogramm der Realprobe
$A_{\text{Amin-Kalib}}$	Peak-Fläche des Inneren Standards im Chromatogramm der Realprobe
$A_{\text{IS-Probe}}$	Peak-Fläche des Amins im Chromatogramm der Kalibrierprobe
$A_{\text{IS-Kalib}}$	Peak-Fläche des Inneren Standards im Chromatogramm der Kalibrierprobe
$m_{\text{Amin-Kalib}}$	Masse des Amins in der Kalibrierprobe, meist 10 µg (5 µg für 4-Aminoazobenzen)