

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Hexamethylendiisocyanat, 2,4-Toluylendiisocyanat, 2,6-Toluylendiisocyanat, Isophorondiisocyanat und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat – Bestimmung von Hexamethyldiamin, 2,4-Toluyldiamin, 2,6-Toluyldiamin, Isophorondiamin und 4,4'-Diaminodiphenylmethan in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Biomonitoring-Methode

J. Cocker¹, K. Jones¹, G. Leng², W. Gries², L.T. Budnik³, J. Müller⁴, T. Göen^{4,5,*}, A. Hartwig^{6,*}, MAK Commission^{7,*}

¹ Methodenentwicklung, Health & Safety Laboratory, Harpur Hill, Buxton SK17 9JN, Vereinigtes Königreich

² Methodenprüfung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SI-GS – Institut für Biomonitoring, 51368 Leverkusen

³ Methodenprüfung, Zentralinstitut für Arbeitsmedizin und Maritime Medizin (ZfAM), Marckmannstraße 129 b, Haus 3, 20539 Hamburg

⁴ Methodenprüfung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

⁵ Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

⁶ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁷ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* E-Mail: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Keywords: Hexamethylendiisocyanat; Toluylendiisocyanat; Isophorondiisocyanat; Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat; Hexamethyldiamin; Toluyldiamin; Isophorondiamin; 4,4'-Diaminodiphenylmethan; Urin; GC-MS

Citation Note: Cocker J, Jones K, Leng G, Gries W, Budnik LT, Müller J, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Hexamethylendiisocyanat, 2,4-Toluylendiisocyanat, 2,6-Toluylendiisocyanat, Isophorondiisocyanat und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat – Bestimmung von Hexamethyldiamin, 2,4-Toluyldiamin, 2,6-Toluyldiamin, Isophorondiamin und 4,4'-Diaminodiphenylmethan in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2017 Jul;2(3):1436-1458]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2026. https://doi.org/10.34865/bi82206d0022_w

Neuveröffentlichung (Online): 07 Aug 2026

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi82206d0022>

Manuskript abgeschlossen: 03 Nov 2011

Erstveröffentlichung (Online): 31 Jul 2017

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Hexamethylene diisocyanate, 2,4-toluene diisocyanate, 2,6-toluene diisocyanate, isophorone diisocyanate and 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate – Determination of hexamethylenediamine, 2,4-toluenediamine, 2,6-toluenediamine, isophoronediamine and 4,4'-methylenedianiline in urine using gas chromatography-mass spectrometry

[Hexamethylendiisocyanat, 2,4-Toluylendiisocyanat, 2,6-Toluylendiisocyanat, Isophorondiisocyanat und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat – Bestimmung von Hexamethyldiamin, 2,4-Toluyldiamin, 2,6-Toluyldiamin, Isophorondiamin und 4,4'-Diaminodiphenylmethan in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie]

Biomonitoring Methods in German language

J. Cocker¹, K. Jones¹, G. Leng², W. Gries², L.T. Budnik³, J. Müller⁴, T. Göen^{5,*}, A. Hartwig^{6,*}, MAK Commission^{7,*}

DOI: 10.1002/3527600418.bi82206d0022

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area verified the present biomonitoring method. The described method allows the simultaneous determination of the metabolites of hexamethylene diisocyanate (HDI), 2,4-toluenediamine and 2,6-toluene diisocyanate (TDI), isophorone diisocyanate (IPDI) and methylene diphenyl diisocyanate (MDI) in human urine. After acid hydrolysis the released amines, hexamethylenediamine (HDA), 2,4-, and 2,6-toluenediamine (TDA), isophorone diamine (IPDA) and 4,4'-methylenedianiline (4,4'-MDA) are extracted from urine, derivatised using heptafluorobutyric anhydride and quantified by NCI-GC-MS. The method was extensively validated and the reliability data were confirmed by independent laboratories, which have established and cross-checked the whole procedure

Keywords

Hexamethylendiisocyanat; HDI; 2,4-Toluylendiisocyanat; 2,4-TDI; 2,6-Toluylendiisocyanat; 2,6-TDI; Isophorondiisocyanat; IPDI; Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat; MDI; Hexamethyldiamin; HDA; 2,4-Toluyldiamin; 2,4-TDA; 2,6-Toluyldiamin; 2,6-TDA; Isophorondiamin; IPDA; 4,4'-Diaminodiphenylmethan; MDA; Urin; Biomonitoring; Analysen in biologischem Material; Gaschromatographie

Author Information

¹ Methodenentwicklung, Health & Safety Laboratory, Harpur Hill, Buxton SK17 9JN, Großbritannien

² Methodenentwicklung, Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SI-GS-Institut für Biomonitoring, Gebäude L9, 51368 Leverkusen

³ Methodenprüfung, Zentralinstitut für Arbeitsmedizin und Maritime Medizin (ZfAM), Marckmannstraße 129 b, Haus 3, 20539 Hamburg

⁴ Methodenprüfung, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

⁵ Methodenprüfung und Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schillerstraße 25 und 29, 91054 Erlangen

⁶ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

⁷ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* Email: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Hexamethylendiisocyanat, 2,4-Toluylen-diisocyanat, 2,6-Toluylendiisocyanat, Isophorondiisocyanat und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat – Bestimmung von Hexamethyldiamin, 2,4-Toluyldiamin, 2,6-Toluyldiamin, Isophorondiamin und 4,4'-Diaminodiphenylmethan in Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	Hexamethylendiisocyanat, 2,4- und 2,6-Toluylendiisocyanat, Isophorondiisocyanat, Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat
Analyt. Messprinzip:	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS)
Abgeschlossen im:	November 2011

Übersicht über die mit dieser Methode erfassbaren Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
Hexamethylendiisocyanat (HDI)	822-06-0	Hexamethyldiamin (HDA)	124-09-4
Hexamethyldiamin (HDA)	124-09-4		
2,4-Toluylendiisocyanat (2,4-TDI)	584-84-9	2,4-Toluyldiamin (2,4-TDA)	95-80-7
2,4-Toluyldiamin (2,4-TDA)	95-80-7		
2,6-Toluylendiisocyanat (2,6-TDI)	91-08-7	2,6-Toluyldiamin (2,6-TDA)	823-40-5
2,6-Toluyldiamin (2,6-TDA)	823-40-5		
Isophorondiisocyanat (IPDI)	4098-71-9	Isophorondiamin (IPDA)	2855-13-2
Isophorondiamin (IPDA)	2855-13-2		
Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI)	101-68-8	4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA)	101-77-9
4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA)	101-77-9		

Zusammenfassung

Das beschriebene Verfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der Metaboliten von Hexamethylendiisocyanat (HDI), 2,4- und 2,6-Toluylendiisocyanat (TDI), Isophorondiisocyanat (IPDI) und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI) im Urin. Nach Säurehydrolyse werden die freigesetzten Amine Hexamethyldiamin (HDA), 2,4- und 2,6-Toluyldiamin (TDA), Isophorondiamin (IPDA) und 4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA) aus der Urinmatrix extrahiert und mit Heptafluorbuttersäureanhydrid derivatisiert. Die Analyse erfolgt nach gaschromatographischer Trennung mit einem massenselektiven Detektor im Selected-Ion-Monitoring-Modus mittels negativ-chemischer Ionisation. Die Kalibrierung erfolgt unter Verwendung von Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise aufgearbeitet und gemessen werden, wie die zu analysierenden Proben.

Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Hexamethylendiamin (HDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 3,3 \%$
	Streubereich	$u = 7,3 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 3,8 µg HDA pro Liter Urin und n = 12 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,6 \%$
	Streubereich	$u = 12,7 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 3,9 µg HDA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit ¹⁾ :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 103 \%$ bzw. 105 %
	bei einer dotierten Konzentration von 1,0 µg bzw. 10 µg HDA pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,2 µg HDA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,7 µg HDA pro Liter Urin	

2,4-Toluyldiamin (2,4-TDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,6 \%$
	Streubereich	$u = 5,7 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 3,3 µg 2,4-TDA pro Liter Urin und n = 12 Bestimmungen	

1439 Biomonitoring Methods

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,1 \%$
	Streubereich	$u = 16,1 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von $3,4 \mu\text{g}$ 2,4-TDA pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Richtigkeit ¹⁾ :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 104 \%$ bzw. 105%
	bei einer dotierten Konzentration von $1,0 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ 2,4-TDA pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,1 \mu\text{g}$ 2,4-TDA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,4 \mu\text{g}$ 2,4-TDA pro Liter Urin	

2,6-Toluyldiamin (2,6-TDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,0 \%$
	Streubereich	$u = 8,8 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von $4,1 \mu\text{g}$ 2,6-TDA pro Liter Urin und $n = 12$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,2 \%$
	Streubereich	$u = 14,0 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von $4,0 \mu\text{g}$ 2,6-TDA pro Liter Urin und $n = 10$ Bestimmungen	
Richtigkeit ¹⁾ :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 95 \%$ bzw. 109%
	bei einer dotierten Konzentration $1,0 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ 2,6-TDA pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,1 \mu\text{g}$ 2,6-TDA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,4 \mu\text{g}$ 2,6-TDA pro Liter Urin	

cis- und trans-Isophorondiamin (cis-IPDA, trans-IPDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 16,8 \%$
	Streubereich	$u = 40,0 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 4,9 µg IPDA pro Liter Urin und n = 12 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 33,6 \%$
	Streubereich	$u = 76,0 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 3,8 µg IPDA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit ¹⁾ :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 92 \%$ bzw. 89 %
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg bzw. 10 µg IPDA pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,2 µg IPDA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,5 µg IPDA pro Liter Urin	

4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 8,1 \%$
	Streubereich	$u = 17,8 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 5,7 µg MDA pro Liter Urin und n = 12 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 13,5 \%$
	Streubereich	$u = 30,5 \%$
	bei einer mittleren Konzentration von 5,4 µg MDA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	
Richtigkeit ¹⁾ :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 105 \%$ bzw. 101 %
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg bzw. 10 µg MDA pro Liter Urin und n = 6 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,1 µg MDA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,4 µg MDA pro Liter Urin	

1) Die Richtigkeit wurde vom Methodenprüfer unter Verwendung der durch eigene Laborsynthese hergestellten internen Standards d₄-2,6-TDA, d₄-2,4-TDA, d₄-MDA und d₈-1,6-HDA ermittelt.

Allgemeine Informationen zu Diisocyanaten und deren Diaminen

Diisocyanate sind farblose bis schwach gelbe Flüssigkeiten oder niedrig schmelzende Feststoffe, die sich durch ihre reaktiven Isocyanatgruppen auszeichnen. Mit ihren NCO-Gruppen reagieren die Diisocyanate mit Polyolen zu Polyurethanen und mit Polyaminen (bzw. Wasser) zu Polyharnstoffen. Auch die Dimerisierung zu Uretidionen und die Trimerisierung zu Isocyanuraten sind von großer Bedeutung [Römpf 2017].

Diisocyanate sind häufig eingesetzte Arbeitsstoffe, die industriell sehr vielfältig verwendet werden. Zu den bekanntesten Vertretern der Diisocyanate zählen Toluylendiisocyanat (TDI), Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI), Hexamethylen-diisocyanat (HDI) sowie Isophorondiisocyanat (IPDI). Die aromatischen Diisocyanate 2,4-TDI, 2,6-TDI und MDI werden als Ausgangssubstanzen für die Herstellung von Polyurethanen, Spezialkunststoffen, Lack- und Kleberohstoffen, Gießelastomeren, Bauschäumen, 2-Komponenten-Klebern sowie Parkettklebstoffen verwendet. Das aliphatische Diisocyanat HDI wird u. a. als Härter in 2-Komponenten-Polyurethanlacken und Parkettversiegelungsmitteln eingesetzt. Das cycloaliphatische IPDI wird ebenfalls als Härter in 2-Komponenten-Polyurethanlacken und in Pulverlacken verwendet [Römpf 2017].

Neben den Diisocyanaten werden auch die entsprechenden Diamine in der Industrie eingesetzt, beispielsweise als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Polyamiden (HDA), als Zwischenprodukte bei der Farbstoffherstellung (2,4-TDA, 2,6-TDA und MDA) sowie als Härter für Epoxidharze bzw. Binder für Drucktinten (IPDA) [Römpf 2017].

Am Arbeitsplatz können die Diisocyanate sowohl inhalativ als auch dermal aufgenommen werden, wobei das Risiko einer inhalativen Aufnahme vom Dampfdruck der Verbindung, von der Verarbeitungstemperatur und der ausgeführten Tätigkeit abhängt. Bei den Diisocyanaten steht neben der sensibilisierenden Wirkung die irritierende Wirkung auf den Atemtrakt im Vordergrund. Durch Reizwirkung kann es konzentrationsabhängig zu Beschwerden an Augen und Atemwegen kommen, wobei die akute Reizwirkung der einzelnen Isocyanate unterschiedlich ausgeprägt ist. Auch bei der chronischen Toxizität steht die Einwirkung auf den Respirationstrakt im Vordergrund [Henschler 1984].

Darüber hinaus sind 2,4-TDI, 2,6-TDI und MDI als kanzerogene Arbeitsstoffe eingestuft. Eine Zusammenfassung der toxikologischen Einstufung durch die Kommission ist in Tabelle 1 gegeben [DFG 2016]. Details zur Bewertung der einzelnen Verbindungen können den toxikologisch-arbeitsmedizinischen Begründungen der Kommission entnommen werden [Henschler 1984; Greim 1996; Greim 1999; Greim 2004; Greim 2008].

Um die inhalative Exposition zu verringern, werden die Diisocyanate oft als Polyisocyanate eingesetzt. Diese polymerisierten Verbindungen auf der Basis von Diisocyanaten (z. B. in Farben und Lacken) bestehen aus Dimeren, Trimeren oder kurzkettigen Polymeren mit endständigen Isocyanatgruppen. Diese besitzen eine deutlich geringere Flüchtigkeit, enthalten aber häufig noch Restmengen der entsprechenden Monomere, sodass auch durch diese Produkte eine Exposition gegenüber Diisocyanaten möglich ist.

Tab. 1 Toxikologisch-arbeitsmedizinische Bewertung verschiedener Diisocyanate und Diamine durch die Kommission [DFG 2016].

Arbeitsstoff	MAK [ppm (mg/m ³)]	Krebs- erzeugend Kategorie	H, S Markie- rung	Beurteilungswert im biologischem Material
Hexamethylen- diisocyanat (HDI)	0,005 (0,035)	–	Sah	BAT 15 µg HDA pro g Kreatinin (nach Hydrolyse)
Toluylendiisocyanat (2,4-TDI und 2,6-TDI)	–	3 A	Sah	–
2,4-Toluylendiamin (2,4-TDA)	–	2	H Sh	EKA 2,4-TDA in Urin (nach Hydrolyse)
Isophorondiisocyanat (IPDI)	0,005 (0,046)	–	Sah	–
Isophorondiamin (IPDA)	–	–	Sh	–
Diphenylmethan-4,4'- diisocyanat (MDI)/poly- meres MDI	– (0,05 E)	4	H Sah	BLW 10 µg MDA pro Liter Urin (nach Hydrolyse)
4,4'-Diaminodiphenyl- methan (MDA)	–	2	H Sh	BAR <0,5 µg MDA pro Liter Urin (nach Hydrolyse)

Der Metabolismus der Diisocyanate ist recht komplex und bisher nicht abschließend aufgeklärt. Gemeinsames Merkmal der Diisocyanate ist die sehr reaktive Isocyanatfunktion (Abbildung 1), die im Körper mit Nukleophilen reagiert, um Addukte mit Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu bilden. Zum Nachweis einer Exposition gegenüber Diisocyanaten wird die Bestimmung des jeweiligen Diamins im Urin durchgeführt. Diese als Biomarker quantifizierten Diamine entstehen vermutlich nicht im Rahmen des Metabolismus, sondern werden im Untersuchungsmaterial aus den unterschiedlichen Isocyanataddukten durch Hydrolyse freigesetzt. Die Ausbeute an Biomarkern hängt dabei von der jeweils angewendeten Hydrolysemethode, vom Probenahmezeitpunkt und von der Expositionsroute ab. Grundsätzlich sind die verwendeten Belastungsmarker nicht Isocyanat-spezifisch; so kann beispielsweise nicht zwischen einer Exposition gegenüber Diaminen bzw. den jeweiligen monomeren oder polymeren Diisocyanaten unterschieden werden.

Untersuchungen zur Diaminkonzentration im Urin nach Säurehydrolyse zeigten, dass bei Probanden nach inhalativer Exposition gegenüber 2,4- bzw. 2,6-TDI, 15–20 % der Dosis als 2,4-TDA bzw. 17–23 % der Dosis als 2,6-TDA im Urin wiedergefunden wurden [Brorson et al. 1991]. Skarping et al. [1991] fanden mit 8–14 % der eingeatmeten Dosis für 2,4-TDI und 14–18 % der Dosis für 2,6-TDI ähnliche Werte. Nach HDI- bzw. IPDI-Exposition konnten Tinnerberg et al. [1995] nach Säure-

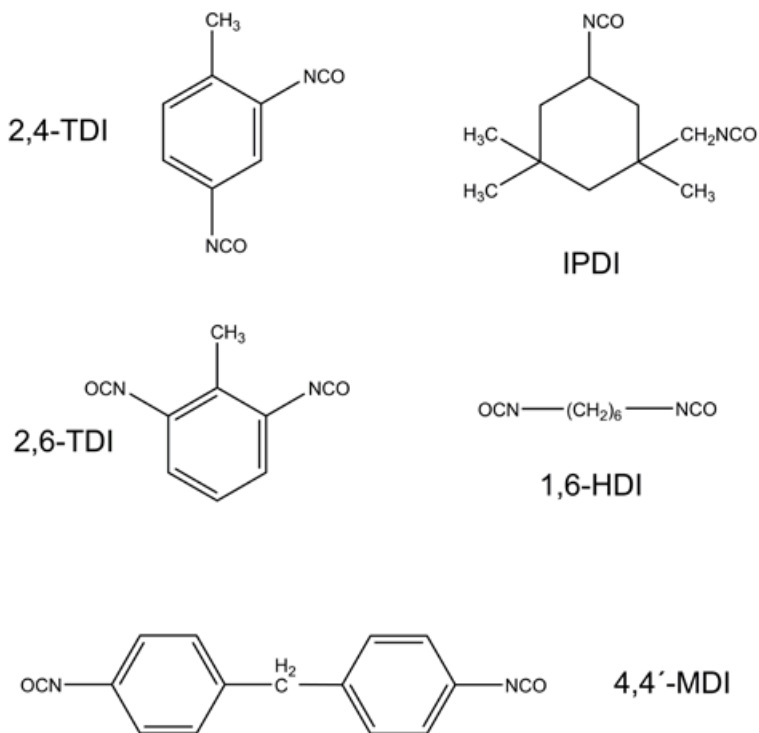


Abb. 1 Strukturformeln der mit dieser Methode bestimmbaren Diisocyanate.

hydrolyse im Mittel 39 % der Dosis (Bereich 9–94 %) als HDA wiederfinden und im Mittel 27 % der Dosis (Bereich 19–46 %) als IPDA.

Die erste Eliminationshalbwertszeit der TDI-Addukt-Fragmente im Urin wird mit 1,9 h für 2,4-TDI und mit 1,6 h für 2,6-TDI angegeben, wobei für beide Isomere eine zweite Halbwertszeit von etwa 5 h beschrieben ist [Brorson et al. 1991; Skarping et al. 1991]. Die Halbwertszeit der TDI-Addukt-Fragmente in Plasma ist deutlich länger und wird mit 10 und 21 Tagen angegeben [Lind et al. 1996, 1997]. Nach MDI-Belastung wurde eine bis zu vierstündige Halbwertszeit für die Ausscheidung der MDI-Addukt-Fragmente im Urin beschrieben [Schütze et al. 1995; Sepai et al. 1995]. Die mittlere Halbwertszeit für die HDI-Addukt-Fragmente im Urin beträgt 2,5 h [Brorson et al. 1990; Greim 1996; Tinnerberg et al. 1995] und für die IPDI-Addukt-Fragmente im Urin 2,8 h [Tinnerberg et al. 1995].

Unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeiten empfiehlt sich für das Biomonitoring der Diisocyanate eine Probennahme bei Arbeitsende/Schichtende.

Verschiedene Probanden- und Arbeitsplatzstudien zeigten eine gute Korrelation zwischen den Diamingehalten im Urin und der Luftkonzentration an TDI [Brorson et al. 1991; Kääriä et al. 2001 a; Maitre et al. 1996; Persson et al. 1993; Rosenberg

und Savolainen 1986], HDI [Maitre et al. 1996; Tinnerberg et al. 1995] sowie IPDI [Tinnerberg et al. 1995] und den Diamingehalten im Urin. In Feldstudien konnte zudem gezeigt werden, dass das biologische Monitoring auch zum Nachweis geringer Isocyanatexpositionen geeignet ist. So konnten Persson et al. [1993] TDA im Urin von Arbeitern nachweisen, die gegenüber TDI-Konzentrationen im Bereich von 0,4–4 µg/m³ exponiert waren. Entsprechend ließ sich MDA im Urin MDI-exponierter Arbeiter bestimmen, bei denen die Ergebnisse der Luftmessungen unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze von 20–30 µg/m³ lagen [Kääriä et al. 2001 b; Schütze et al. 1995].

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens	471
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	472
2.1	Geräte	472
2.2	Chemikalien	472
2.3	Lösungen	473
2.4	Interne Standards	474
2.5	Kalibrierstandards	475
3	Probenahme und Probenaufbereitung	475
3.1	Probenahme	475
3.2	Probenaufbereitung	476
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen	476
4.1	Gaschromatographie	476
4.2	Massenspektrometrie	477
5	Analytische Bestimmung	477
6	Kalibrierung	478
7	Berechnung der Analysenergebnisse	478
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung	478
9	Beurteilung des Verfahrens	479
9.1	Präzision	479
9.2	Richtigkeit	480
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	480
9.4	Störeinflüsse	481
10	Diskussion der Methode	481
11	Literatur	482
12	Anhang	484

1 Grundlage des Verfahrens

Das beschriebene Verfahren ermöglicht die simultane Bestimmung der Metaboliten von Hexamethylendiisocyanat (HDI), 2,4- und 2,6-Toluylendiisocyanat (TDI), Isophorondiisocyanat (IPDI) und Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI) im Urin. Nach Säurehydrolyse werden die freigesetzten Amine Hexamethyldiamin

(HDA), 2,4- und 2,6-Toluendiamin (TDA), Isophorondiamin (IPDA) und 4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA) aus der Urinmatrix extrahiert und mit Heptafluorbuttersäureanhydrid derivatisiert. Die Analyse erfolgt nach gaschromatographischer Trennung mit einem massenselektiven Detektor im Selected-Ion-Monitoring-Modus mit negativ-chemischer Ionisation. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise aufgearbeitet werden wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer und Datenverarbeitungssystem (HP 6890 GC mit HP 5973 MS)
- Gaschromatographische Säule: Länge: 30 m; innerer Durchmesser: 0,32 mm; Filmdicke: 1 µm; stationäre Phase: 5 % Biphenyl – 95 % Dimethylpolysiloxan (z. B. BP5 von SGE)
- Präzisionswaage (z. B. Sartorius)
- Thermostatisierbares Wasserbad (z. B. Haake Messtechnik)
- Block-Thermostat (z. B. Grant Instruments Cambridge)
- Evaporationsstation (z. B. ReactiVap III, Pierce)
- Wippschüttler (z. B. RM 5, CAT)
- Laborzentrifuge (z. B. Heraeus)
- Vortex-Mixer (z. B. Scientific Industries)
- Verschiedene Bechergläser (z. B. VWR)
- 10 mL- und 100 mL-Messkolben (z. B. Brand)
- 5 mL- und 10 mL-Schraubgläser mit teflonkaschierten Gummisepten und Schraubverschlusskappen (z. B. Macherey-Nagel)
- 1,8 mL-Gewindeflaschen mit PTFE-Septen und Schraubdeckeln (z. B. VWR)
- 200 µL-Mikroreinsätze für GC-Gläschen (z. B. VWR)
- Mikroliterpipetten, variabel zwischen 10 und 100 µL sowie zwischen 100 und 1000 µL mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf)
- Urinbecher aus Polypropylen (z. B. Sarstedt)

2.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- Diethylether für die HPLC (z. B. EMD Millipore Nr. 1.00921)
- Toluol für die HPLC (z. B. Fisher Chemical Nr. T290SK-1)
- 4,4'-Diaminodiphenylmethan, 99 % (z. B. Sigma-Aldrich Nr. 31640)
- 1,6-Hexamethylendiamin, 98 % (z. B. Aldrich Nr. H11696)
- 1,6-¹³C₂-Hexamethylendiamin (z. B. Aldrich Nr. 491160)
- 1,7-Heptamethylendiamin, 98 % (z. B. Aldrich Nr. D17408)

- 2,6-Toluylendiamin (z. B. Aldrich Nr. 148113)
- 2,4-Toluylendiamin (z. B. Supelco Nr. 442311)
- d₃-2,4-Toluylendiamin (z. B. CDN Isotopes Nr. D-5472)
- d₈-4,4'-Diaminodiphenylmethan (z. B. CDN Isotopes Nr. D-6240)
- Isophorondiamin (Gemisch der cis-/trans-Stereoisomeren, z. B. EMD Millipore Nr. 8.14123)
- Heptafluorbuttersäureanhydrid für die Derivatisierung 99 % (z. B. Aldrich Nr. 394912)
- Salzsäure 0,1 M (z. B. Aldrich)
- Natronlauge 10 M (z. B. Fisher)
- Schwefelsäure konzentriert (z. B. EMD Millipore Nr. 07208-M)
- Zitronensäure (z. B. Sigma-Aldrich Nr. 33114)
- Urin (20 mL) einer Person ohne bekannte Exposition gegenüber Diisocyanaten

2.3 Lösungen

Stammlösungen

- Stammlösung 1,6-Hexamethylendiamin (HDA) (116 mg/L, 1 mM)
11,6 mg 1,6-Hexamethylendiamin werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Stammlösung 2,4-Toluylendiamin (2,4-TDA) (122 mg/L, 1 mM)
12,2 mg 2,4-Toluylendiamin werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Stammlösung 2,6-Toluylendiamin (2,6-TDA) (122 mg/L, 1 mM)
12,2 mg 2,6-Toluylendiamin werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Stammlösung Isophorondiamin (IPDA) (170 mg/L, 1 mM)
17 mg Isophorondiamin werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Stammlösung 4,4'-Diaminodiphenylmethan (MDA) (198 mg/L, 1 mM)
19,8 mg 4,4'-Diaminodiphenylmethan werden genau eingewogen, in 5 mL 0,1 M Salzsäure gelöst und quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei -20 °C gelagert.

Die bei -20 °C gelagerten Stammlösungen sind mindestens zwei Jahre ohne nennenswerte Verluste haltbar.

Arbeitslösungen

- Arbeitslösung der Diisocyanatbiomarker (4 µM)

Es wird eine Arbeitslösung aller fünf Biomarker angesetzt, indem 400 µL der jeweiligen Stammlösung in einen 100 mL-Messkolben pipettiert werden und der Messkolben bis zur Marke mit 0,1 M Salzsäure aufgefüllt wird. Die Lösung wird gemischt, in GC-Gläschen zu je 0,75 mL aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Die aktuell genutzte Arbeitslösung wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert und ist bei dieser Temperatur ohne nennenswerte Verluste haltbar.

2.4 Interne Standards

Stammlösungen

- Stammlösung 1,7-Heptamethyldiamin (HpDA) (130 mg/L, 1 mM)
13 mg HpDA werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei –20 °C gelagert.
- Stammlösung d₈-4,4'-Diaminodiphenylmethan (d₈-MDA) (206 mg/L, 1 mM)
20,6 mg d₈-MDA werden genau eingewogen und mit 5 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei –20 °C gelagert.
- Stammlösung 1,6-¹³C₂-Hexamethyldiamin (¹³C-HDA) (1000 mg/L)
100 mg ¹³C-HDA werden genau eingewogen und mit 10 mL 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 100 mL-Messkolben überführt. Die Lösung wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei –20 °C gelagert.
- Stammlösung d₃-2,4-Toluyldiamin (d₃-2,4-TDA) (1000 mg/L)
10 mg d₃-2,4-Toluyldiamin werden genau eingewogen und mit 0,1 M Salzsäure quantitativ in einen 10 mL-Messkolben überführt. Es wird mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei –20 °C gelagert.

Arbeitslösungen

- Arbeitslösung d₃-2,4-Toluyldiamin (d₃-2,4-TDA) (1,5 mg/L)

Es werden 150 µL der Stammlösung von d₃-2,4-Toluyldiamin in einen 100 mL-Messkolben überführt und mit 0,1 M Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und anschließend in Schraubgläsern umgefüllt und bei –20 °C gelagert. Die aktuell genutzte Arbeitslösung wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert und ist bei dieser Temperatur ohne nennenswerte Verluste haltbar.

- Arbeitslösung der internen Standards (1,3 mg/L HpDA, 1,5 mg/L ^{13}C -HDA, 0,2 mg/L d_8 -MDA, 0,075 mg/L d_3 -2,4-TDA)

Es wird eine Arbeitslösung der internen Standards angesetzt indem 150 μL ^{13}C -HDA, 1 mL HpDA und 100 μL d_8 -MDA der jeweiligen **Stammlösungen** sowie 5 mL der d_3 -2,4-Toluyldiamin **Arbeitslösung** in einen 100 mL Messkolben überführt und mit 0,1 M HCl zur Marke aufgefüllt wird.

Die aktuell genutzte Arbeitslösung wird bei +4 °C im Kühlschrank gelagert und ist bei dieser Temperatur ohne nennenswerte Verluste haltbar.

2.5 Kalibrierstandards

Die Kalibrierstandards werden in Urin von Personen ohne bekannte Exposition gegenüber Diisocyanaten bzw. Diaminen frisch angesetzt. Dazu wird die wässrige Arbeitslösung der Diisocyanatbiomarker nach Abschnitt 2.3 gemäß dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema mit Urin zu einem Endvolumen von 2 mL gemischt. Es werden Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0–300 nM erhalten. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Proben wie unter Abschnitt 3 angegeben.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen.

Kalibrierpunkt	Dotierung [nM]	Volumen Arbeitslösung [μL]	Volumen Poolurin [μL]
K0	0	0	2000
K1	50	25	1975
K2	100	50	1950
K3	150	75	1925
K4	200	100	1900
K5	250	125	1875
K6	300	150	1850

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Die Probenahme erfolgt am Ende der Exposition gegenüber den Diisocyanaten oder den entsprechenden Diaminen. Hierfür werden 30 mL-Urinbecher, in denen 0,5 g Zitronensäure vorgelegt ist, verwendet. Erfolgt der Transport ungekühlt, sollten die Proben das Labor innerhalb von zwei Tagen erreichen. Bis zur Analyse sollten die Proben bei –20 °C aufbewahrt werden.

3.2 Probenaufbereitung

Zur Aufarbeitung werden die Urinproben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. 2 mL der Urinproben werden jeweils in 10 mL-Probengläschen pipettiert und 100 µL der Dotierlösung der internen Standards sowie 200 µL konzentrierte Schwefelsäure zu jeder Probe hinzugefügt. Die Schraubgläser werden verschlossen, geschüttelt und für die Hydrolyse bei $>98^{\circ}\text{C}$ in ein Wasserbad gestellt. Nach 90 Minuten nimmt man die Gläser aus dem Wasserbad und lässt sie auf Raumtemperatur abkühlen. In jedes Gläschen werden 2 mL einer 10 M Natronlauge gegeben und gut gemischt. Anschließend werden 4 mL Diethylether zugegeben und die Gläser verschlossen. Der Probenansatz wird 20 min lang auf einem Rollschüttler gemischt und im Anschluss 5 min zentrifugiert ($2200 \times g$). Etwa 3 mL des Überstands werden in ein neues Schraubglas überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom ($<50\text{ mL/min}$) bei $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$ vorsichtig abgeblasen. Der Rückstand wird in 200 µL Toluol aufgenommen und 20 µL Heptafluorbuttersäureanhydrid werden zugegeben. Die Gläser werden verschlossen und die Analyten 60 min bei 55°C derivatisiert. Nach dem Abkühlen werden das Toluol und das überschüssige Derivatisierungsmittel im Stickstoffstrom ($<50\text{ mL/min}$) bei $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$ bis zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wird in 100 µL Toluol aufgenommen, in das Microinsert eines GC-Gläschen überführt und mittels GC-MS vermessen.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

4.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	BP5 (5 % Biphenyl-95 % Dimethylpolysiloxan)
	Länge:	30 m
	Innerer Durchmesser:	0,32 mm
	Filmdicke:	1 µm
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 150°C für 2 min, dann Anstieg 10°C/min auf 240°C , dann Anstieg 20°C/min auf 300°C , 5 min bei Endtemperatur
	Injektor:	350°C
	Transferline:	300°C
Trägergas:	Helium 5,0	
	Fluss:	0,9 mL/min
Injektionsvolumen:	2 µL; splitlos (30 s)	

4.2 Massenspektrometrie

Die Detektion erfolgt im Selected-Ion-Monitoring-Modus mit negativ-chemischer Ionisation unter Verwendung von Methan als Reaktantgas.

Ionisationsart:	negative chemische Ionisation (NCI)
Ionisationsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	150 °C
Dwell time:	100 ms
Solvent delay:	3 min
Detektionsmodus:	Selected-Ion-Monitoring

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung der nach Abschnitt 3.2 aufgearbeiteten Urinproben werden die GC-Gläschen in das Messgerät gestellt und je 2 µL Probe splitlos in das GC-MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und anhand charakteristischer Ionenspuren. Die für die angegebenen GC-Bedingungen (siehe Abschnitt 4) resultierenden Retentionszeiten sowie die charakteristischen Ionenspuren der Analyten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender dieser Methode hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten

Tab. 3 Charakteristische Zerfallsprodukte und Retentionszeiten der Analyten und der dazugehörigen internen Standards.

Analyt	Ionen (m/z) Quantifier, Qualifier	Retentionszeit (min)
2,6-TDA	495	10,2
HDA	488, 448, 449	10,4
¹³ C-HDA	490	10,4
d ₃ -2,4-TDA	498	10,6
2,4-TDA	495	10,7
cis-IPDA	542	11,4
trans-IPDA	542	11,8
HpDA	462	12,0
MDA	571	16,7
d ₈ -MDA	574	16,7

Kapillarsäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. In den Abbildungen 2 und 3 im Anhang sind Chromatogramme einer mit den Analyten dotierten Urinprobe dargestellt.

6 Kalibrierung

Die in Urin angesetzten Kalibrierstandards werden analog zu den Urinproben entsprechend Abschnitt 3.2 aufgearbeitet und mit GC-MS (vergl. Abschnitt 4 und 5) analysiert. Für jeden Analyten wird eine Kalibriergerade erstellt, indem das Verhältnis der Peakflächen des Analyten und des jeweiligen internen Standards gegen die Analytkonzentration aufgetragen wird. Für IPDA wird der interne Standard HpDA, für HDA wird ^{13}C -HDA, für 2,4- und 2,6-TDA wird d_3 -2,4-TDA und für MDA wird d_8 -MDA als interner Standards verwendet.

Die Kalibriergeraden sind im betrachteten Konzentrationsbereich von 0 bis 300 nM linear und sollten Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,99$ für alle Analyten aufweisen.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Ermittlung der jeweiligen Analytkonzentration in einer Probe wird das Peakflächenverhältnis von Analyt und internem Standard durch die Steigung der entsprechenden Kalibrierkurve geteilt. Proben, deren Werte über 300 nM und damit außerhalb des kalibrierten Arbeitsbereichs liegen, sollten verdünnt und erneut analysiert werden.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieses Bandes verfahren [Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2008]. Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie Qualitätskontrollen mit untersucht, die eine bekannte und konstante Analytkonzentration aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden.

Zur Herstellung von Qualitätskontrollmaterial wird Urin von einer Person ohne bekannte Exposition gegenüber Diisocyanaten oder den entsprechenden Diaminen verwendet. Die Urinprobe wird mit 5 % 6 M Salzsäure angesäuert und danach mit dem jeweiligen Diamin in einer Konzentration von 50 nmol/L versetzt. Das Qualitätskontrollmaterial wird zu je 5 mL in Schraubgläsern aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Qualitätskontrollmaterial sollte im Anschluss an die Kalibriergerade sowie nach jedem fünften Probenpaar vermessen werden. Der Sollwert und die Toleranzberei-

che (Mittelwert $\pm$ zwei Standardabweichungen) des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt [Bader et al. 2010].

9 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Validierung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bewiesen.

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurden Urinproben mit den Analyten dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Bei zwölfmaliger Bestimmung dieser Urinproben ergaben sich die in Tabelle 4 dokumentierten Präzisionen in Serie.

Zur Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag wurden mit den Analyten dotierte Urinproben aufgearbeitet und analysiert. Bei zehnfacher Bestimmung dieser Urinproben ergaben sich die in Tabelle 5 dokumentierten Präzisionsdaten.

Tab. 4 Präzision in Serie für die Bestimmung der Biomarker der untersuchten Diisocyanate im Urin (n = 12).

Analyt	Mittlere Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
HDA	3,8	3,3	7,3
2,4-TDA	3,3	2,6	5,7
2,6-TDA	4,1	4,0	8,8
cis-/trans-IPDA	4,9	16,8	40,0
MDA	5,7	8,1	17,8

Tab. 5 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der Biomarker der untersuchten Diisocyanate im Urin (n = 10).

Analyt	Mittlere Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
HDA	3,9	5,6	12,7
2,4-TDA	3,4	7,1	16,1
2,6-TDA	4,0	6,2	14,0
cis-/trans-IPDA	3,8	33,6	76,0
MDA	5,4	13,5	30,5

9.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde von den Methodenprüfern Urin in einer Konzentration von 1 µg/L bzw. 10 µg/L mit den jeweiligen Analyten dotiert und analysiert. Die relativen Wiederfindungsraten lagen bei 90–105 % bzw. bei 88–109 % (Tabelle 6).

Die Richtigkeit wurde außerdem vom Methodenentwickler durch Teilnahme an externen Ringversuchen des FIOH bestätigt.

Tab. 6 Richtigkeit bei der Bestimmung der Biomarker der untersuchten Diisocyanate im Urin (n = 6).

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/L]	Wiederfindungsrate (rel.)	Standardabweichung (rel.) [%]
HDA	1	103	6,0
	10	105	11,8
2,4-TDA	1	104	2,3
	10	105	2,2
2,6-TDA	1	95	4,8
	10	109	1,5
cis-/trans-IPDA	1	92	16,8
	10	89	17,5
MDA	1	105	8,2
	10	101	3,4

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenzen wurden aus dem dreifachen Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt und die Bestimmungsgrenzen analog festgesetzt (neunfaches Signal-Rausch-Verhältnis). Die so berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Biomarker der untersuchten Diisocyanate.

Analyt	Nachweisgrenze [µg/L]	Bestimmungsgrenze [µg/L]
HDA	0,2	0,7
2,4-TDA	0,1	0,4
2,6-TDA	0,1	0,4
cis-/trans-IPDA	0,2	0,5
MDA	0,1	0,4

9.4 Störeinflüsse

HDA und HpDA sind relativ flüchtige Verbindungen, so dass es in der Proben- aufarbeitung beim Abblasen des Lösungsmittels vor allem bei diesen Analyten zu Analytverlusten kommen kann. Um Analytverluste zu vermeiden, sind niedrige Temperaturen ($<40\text{ }^{\circ}\text{C}$), ein schwacher Stickstoffstrom ($<50\text{ mL/min}$) und das Entfernen der Gläschen, sobald zur Trockne abgeblasen ist, wichtig. Alternative Verfahren zum Entfernen der Lösungsmittel erfordern weiterführende Untersuchungen und eventuell den Einsatz eines Keepers.

Für HDA und HpDA ist darüber hinaus die Extraktionsausbeute gering, was erhebliche Auswirkungen auf die Präzision und die Nachweisgrenze haben kann. Für gute Methodenpräzision und niedrige Nachweisgrenzen ist die Verwendung der internen Standards besonders wichtig.

Neben den vom Methodenentwickler für die Methodenvalidierung verwendeten internen Standards HpDA, ^{13}C -HDA, d_3 -2,4-TDA und d_8 -MDA wurden von den Methodenprüfern die durch laboreigene Synthese hergestellten internen Standards d_8 -HDA, d_4 -2,4-TDA, d_4 -2,6-TDA, und d_4 -MDA verwendet. Mit diesen wurde die Methodenprüfung durchgeführt und die Richtigkeit der Methode ermittelt.

10 Diskussion der Methode

Mit dem vorliegenden Verfahren lässt sich die Exposition gegenüber gängigen Diisocyanaten erfassen und beurteilen. Die durch die Diisocyanate gebildeten Protein-konjugate im Urin werden zu den jeweiligen Aminen hydrolysiert und als solche detektiert. Da sich ohne Hydrolyse im Urin keine freien Diamine nachweisen lassen, ist diese von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde auch eine alkalische Hydrolyse getestet, die bei HDA jedoch zu hohen Hintergrundgehalten führte. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es durch die alkalische Hydrolyse zur HDA-Bildung aus endogenen Substanzen kam oder ob die Interferenz durch einen Co-eluierenden Peak zustande kam. Die Anwendung der sauren Hydrolyse reduzierte die Interferenz und wurde beibehalten.

Die in dieser Methodenvorschrift empfohlenen chromatographischen Bedingungen wurden zugunsten der Analysendauer optimiert. Eine bessere chromatographische Trennung würde durch Verwendung einer $0,2\text{ mm}$ - oder $0,25\text{ mm}$ -Säule mit geringerer Filmdicke erreicht, was jedoch bei der dann benötigten niedrigeren Injektionstemperatur zu längeren Laufzeiten führen würde.

In vielen Produkten, die Diisocyanate enthalten, insbesondere HDI, liegen die Isocyanate als Oligomere oder Polymere mit nur einem kleinen Anteil an freien Diisocyanatmonomeren vor. Es wurden erste Studien zur berufsbedingten Exposition gegenüber Isocyanatlacken, die HDI-Oligomere und wenig freies HDI enthielten, durchgeführt. Den nicht publizierten Beobachtungen zufolge, schienen die im Urin gefundenen HDA-Werte höher zu sein, als bei alleiniger Exposition gegenüber dem HDI-Monomer zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hydrolyse zur Freisetzung von HDA aus oligomeren HDI-Konjugaten führt. Sollte

dies der Fall sein, würde eine Änderung der Hydrolysebedingungen zu veränderten Ergebnissen führen.

Gelegentlich, in etwa einem von hundert Fällen, wird auch HDA nachgewiesen, obwohl es keine offensichtliche berufsbedingte Expositionsquelle gibt. Werden dennoch die spezifischen Ionen im korrekten Verhältnis zur richtigen Retentionszeit nachgewiesen, ist eine Exposition gegenüber HDI oder HDA aus unbekannten Quellen wahrscheinlich. Da einige Reagenzien nachweisbare Mengen an HDA enthalten können und so zu Blindwerten führen, muss auch die Qualität der analytischen Reagenzien, insbesondere des Heptafluorbuttersäureanhydrids, bedacht werden.

Das beschriebene Verfahren wurde im Vereinigten Königreich in vielen Studien zur berufsbedingten Exposition gegenüber Diisocyanaten eingesetzt. In einigen Fällen wurden andere als die erwarteten Diamine nachgewiesen, wobei weiterführende Untersuchungen eher auf eine unbekannte Isocyanatexposition als auf analytische Interferenzen hindeuteten. Die Analysenmethode soll die Beurteilung einer Diisocyanatexposition ermöglichen, doch durch Bestimmung der Diamine im Urin wird durch die Methode auch die entsprechende Diaminexposition erfasst. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte eine mögliche Mischeexposition gegenüber Isocyanaten und Diaminen bedacht werden.

11 Literatur

- Bader M, Barr D, Göen Th, Schaller KH, Scherer G, Angerer J, Arbeitsgruppe Analysen in biologischem Material (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J und Hartwig A (Hrsg): Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.bireliabd0019
- Brorson T, Skarping G, Nielsen J (1990) Biological monitoring of isocyanates and related amines. II. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Int Arch Occup Environ Health* 62: 385–389
- Brorson T, Skarping G, Sango C (1991) Biological monitoring of isocyanates and related amines. IV. 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed plasma and urine after test-chamber exposure of humans to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 63: 253–259
- Bundesärztekammer (2008): Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dt Arztebl* 105: A341–355
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2016) MAK- und BAT-Werte-Liste 2016, Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung Nr. 52, Wiley-VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/9783527805976
- Greim H (Hrsg) (1996) Hexamethylendiisocyanat, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 23. Lieferung, VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.mb82206d0023
- Greim H (Hrsg) (1999) Tolylendiisocyanate, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 28. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.mb58484ismd0028

- Greim H (Hrsg) (2004) Isophorondiisocyanat, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 38. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.mb409871d0038
- Greim H (Hrsg) (2008) Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI), Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 45. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.mb10168stad0045
- Henschler D (Hrsg) (1984) Diisocyanate, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 10. Lieferung, VCH, Weinheim
DOI: 10.1002/3527600418.mb0dicygrpd0010
- Kääriä K, Hirvonen A, Norppa H, Piirilä P, Vainio H, Rosenberg C (2001 a) Exposure to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate (TDI) during production of flexible foam: determination of airborne TDI and urinary 2,4- and 2,6-toluenediamine (TDA). *Analyst* 126: 1025–1031
- Kääriä K, Hirvonen A, Norppa H, Piirilä P, Vainio H, Rosenberg C (2001 b) Exposure to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate (MDI) during moulding of rigid polyurethane foam: determination of airborne MDI and urinary 4,4'-methylenedianiline (MDA). *Analyst* 126: 476–479
- Lind P, Dalene M, Skarping G, Hagmar L (1996) Toxicokinetics of 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed urine and plasma after occupational exposure to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. *Occup Environ Med* 53: 94–99
- Lind P, Dalene M, Tinnerberg H, Skarping G (1997) Biomarkers in hydrolysed urine, plasma and erythrocytes among workers exposed to thermal degradation products from toluene diisocyanate foam. *Analyst* 122: 51–56
- Maitre A, Berode M, Perdrix A, Stoklov M, Mallion JM, Savolainen H (1996) Urinary hexane diamine as an indicator of occupational exposure to hexamethylene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 69: 65–68
- Persson P, Dalene M, Skarping G, Adamsson M, Hagmar L (1993) Biological monitoring of occupational exposure to toluene diisocyanate: measurement of toluenediamine in hydrolysed urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Ind Med* 50: 1111–1118
- Römpf (2017) Thieme Römpf Online Lexikon. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Rosenberg C, Savolainen H (1986) Determination of occupational exposure to toluene diisocyanate by biological monitoring. *J Chromatogr* 367: 385–392
- Schütze D, Sepai O, Lewalter J, Miksche L, Henschler D, Sabbioni G (1995) Biomonitoring of workers exposed to 4,4'-methylenedianiline or 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16: 573–582
- Sepai O, Henschler D, Sabbioni G (1995) Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16: 2583–2587
- Skarping G, Brorson T, Sangö C (1991) Biological monitoring of isocyanates and related amines. III. Test chamber exposure of humans to toluene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 63: 83–88
- Tinnerberg H, Skarping G, Dalene M, Hagmar L (1995) Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isophorone diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 67: 367–374

Entwickler der Methode: J. Cocker, K. Jones

Prüfer der Methode: G. Leng, W. Gries, L. Th. Budnik, J. Müller, Th. Göen

Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: Th. Göen

Vorsitzende der „Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“, Deutsche Forschungsgemeinschaft: A. Hartwig

Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft: MAK Commission

12 Anhang

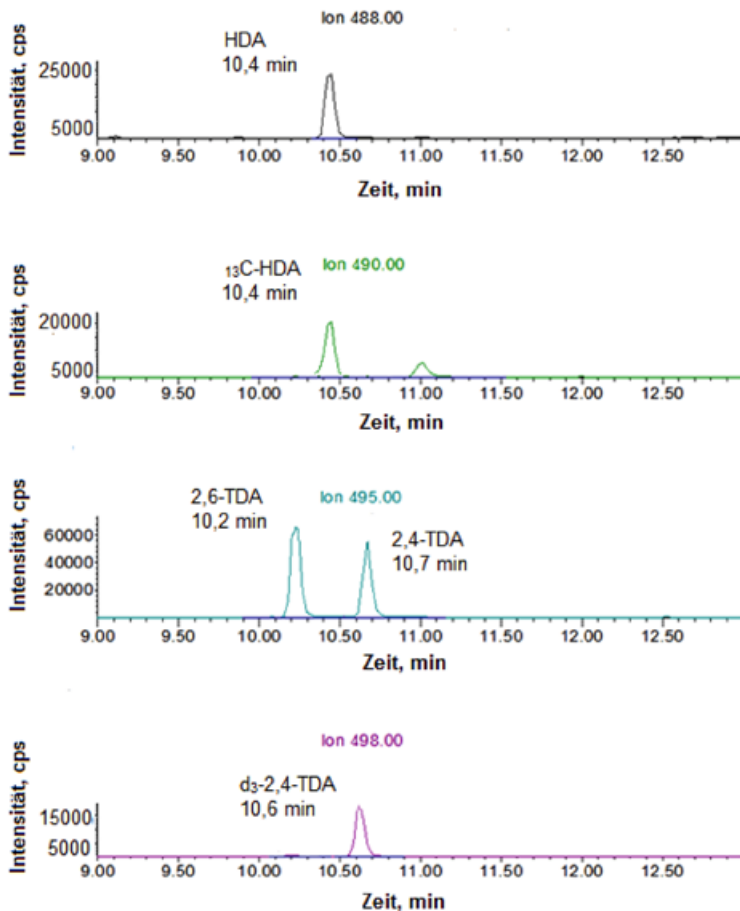


Abb. 2 Chromatogramme einer mit 120 nmol HDA sowie 2,4- und 2,6-TDA je Liter dotierten Urinprobe.

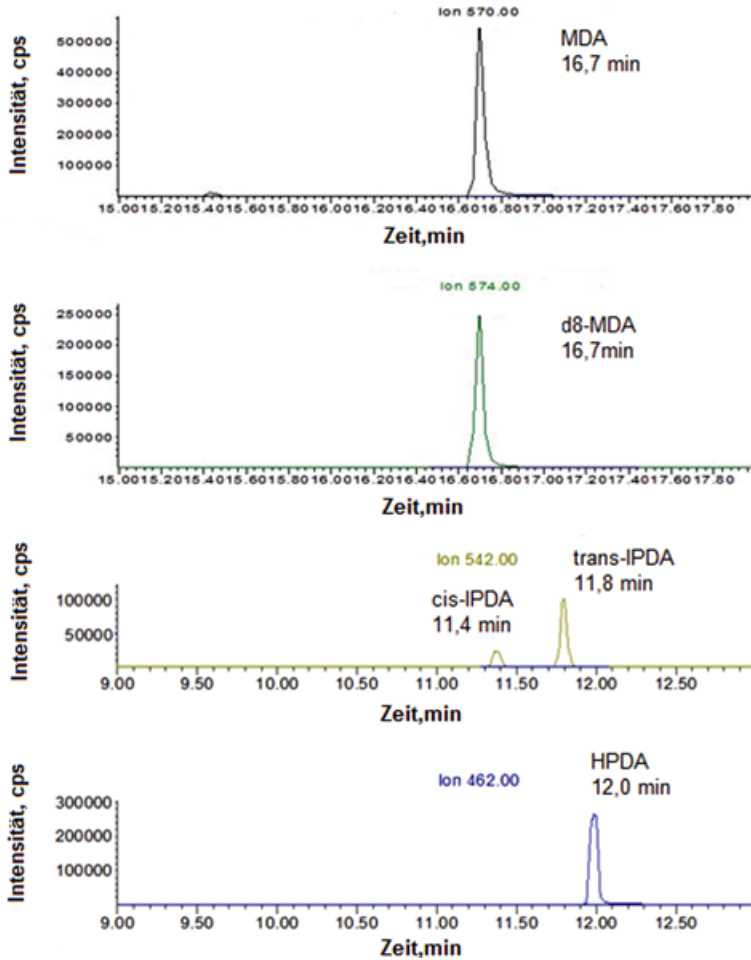


Abb. 3 Chromatogramme einer mit 120 nmol MDA und IPDA je Liter dotierten Urinprobe.