

Karakterisering av teknisk metylendiphenyldiisocyanat med HPTLC och MS

Characterization of technical grade metylendiphenyldiisocyanat using HPTLC and MS



LUNDS
UNIVERSITET

Lunds Tekniska Högskola

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg

Examensarbete:
Carl-Emil Zaar

© Copyright Carl-Emil Zaar

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
Lunds Universitet
Box 882
251 08 Helsingborg

LTH School of Engineering
Lund University
Box 882
SE-251 08 Helsingborg
Sweden

Tryckt i Sverige
Media-Tryck
Biblioteksdirektionen
Lunds Universitet
Lund 2006

Sammanfattning

Isocyanater är en grupp kemiska ämnen som framförallt används vid tillverkning av polyuretan (PUR). PUR förekommer i en mängd olika varianter så som skum i möbler och bilar, men även som färger och lacker. Isocyanaters hälsovådliga effekter är välkända och exponering kan leda till olika typer av luftvägsbesvär (tex bronkit och astma). Det finns många olika metoder beskrivna för att mäta halter av isocyanater i luft.

De isocyanater som används i industriella sammanhang är ofta tekniska kvalitéter som består av olika typer och isomerer av isocyanater.

Försök har visat att det totala isocyanatinnehållet underskattas i vissa tekniska kvalitéter av isocyanater vid bestämning med kromatografiska metoder [1].

Anledningen till detta är oklart, men analyter som är svåra att eluera med omvändfas LC eller allmänt svårlösta analyter skulle kunna vara en förklaring.

I den här rapporten presenteras en metod för att karakterisera tekniska kvalitéter av isocyanaten MDI. Metoden baseras på kromatografisk separation med hjälp av HPTLC och karakterisering av fraktioner från HPTLC-plattan med MS.

Isocyanaterna har analyserats främst som derivat med dibutylamin, men andra derivat har även studerats.

Det gick att påvisa en fraktion med okänt isocyanatinnehåll, på HPTLC-plattan. Strukturen på ingående komponenter kunde inte säkerställas. I upptagna spektra kunde typiska isocyanat-DBA-fragment återfinnas så som $m/z=130$ ($[DBA+H]^+$) och $m/z=156$ ($[DBA+CO]^+$). Identifieringen säkerställdes ytterligare då TMDI derivatiserad med d_{18} -DBA analyserades. Motsvarande fragment som för icke deuteriummärkt DBA återfanns. Antalet isocyanatgrupper i bildade joner kunde även bestämmas.

Nyckelord: Isocyanater, MDI, DBA HPTLC, MS

Abstract

Isocyanates are mainly used for the production of polyurethane (PUR). PUR has a wide range of applications such as foam in furnitures and cars, but also as coatings and lacquers. Isocyanates are well known occupational hazards and exposure may result in severe respiratory disorders. Methods for monitoring occupational exposure is of great importance.

Isocyanates used in industry are often of technical grade qualities that contain mixtures of isocyanates and isocyanate isomers.

Studies have shown that the total isocyanate content is underestimated in some technical grade isocyanates when determined with chromatographic methods [1]. The reason for this is not clear. Analytes that are strongly retained or impossible to elute on reversed phase columns or analytes with low solubility could be a possible explanation.

In this study a method to characterise technical grade MDI is presented. The method is based on chromatographic separation by HPTLC and characterisation of fractions from the HPTLC-plate with MS.

Isocyanates have mainly been studied as dibutylamin derivatives, however other derivatives have been studied as well.

One of the fractions from the HPTLC-plate indicated presence of unknown isocyanates. The structure of the containing components could not be verified. However, the obtained MS-spectra showed typical isocyanate-DBA-fragments such as; $m/z=130$ ($[DBA+H]^+$) och $m/z=156$ ($[DBA+CO]^+$).

Identification was further confirmed when TMDI derivatised with d_{18} -DBA was studied. Equivalent fragments to those given by DBA that was not deuterium labelled was obtained. The number of isocyanate groups on the formed ions was established.

Keywords: Isocyanates, MDI, DBA HPTLC, MS

Förord

Syftet med detta arbete är att utveckla en alternativ metod för att karakterisera tekniska kvalitéer av isocyanaten 4.4-metylendiphenyldiisocyanat. Metoden baseras på separation med tunnskikt-kromatografi och karakterisering med masspektrometri. Arbetet riktar sig främst mot tekniska kvalitéer av isocyanater derivatiserade med dibutylamin och fokuserar sig speciellt på större isocyanater som skulle kunna vara svåra att påvisa med traditionella metoder.

Arbetet utfördes under våren 2006 på Arbetsmiljökemi vid Stockholms universitet i Hässleholm.

Innehållsförteckning

| | |
|--|-----------|
| 1 Inledning | 1 |
| 1.1 Isocyanater | 1 |
| 1.1.1 Exponering och Hälsoeffekter | 2 |
| 1.1.2 Fältnätningar..... | 3 |
| 1.1.3 Bestämning av isocyanathalten i tekniska kvalitéer | 3 |
| 1.2 Syfte | 4 |
| 1.3 Analytiska principer och Instrument | 5 |
| 1.3.1 Vätskekromatografi | 5 |
| 1.3.2 Tunnskikt-kromatografi..... | 5 |
| 1.3.3 Masspektrometri | 7 |
| 2 Material och metod | 10 |
| 2.1 Apparatur | 10 |
| 2.1.1 Tunnskikt-kromatografi..... | 10 |
| 2.1.2 Vätskekromatografi-Masspektrometri | 10 |
| 2.2 Kemikalier | 10 |
| 2.3 Provlösningar | 11 |
| 2.4 Analys av teknisk 4.4-metylendiphenyldiisocyanat med tunnskikt-kromatografi | 11 |
| 2.4.1 Tunnskikt-kromatografi..... | 11 |
| 2.4.2 Derivatens löslighet | 11 |
| 2.5 Kombinerad av tunnskikt-kromatografi och masspektrometri | 12 |
| 2.5.1 Fraktionering av tunnskikt-kromatografi-platta..... | 12 |
| 2.5.2 Extraktion | 12 |
| 2.5.3 Utbyte vid extraktion | 12 |
| 2.5.4 Upprening med tunnskikt-kromatografi | 12 |
| 2.5.5 Derivatisering med olika sekundära aminer | 13 |
| 2.5.6 Derivatisering med deuteriummärkt dibutylamin | 13 |
| 2.6 Masspektrometrisk karakterisering | 14 |
| 2.6.1 Bestämning av identifierbar mängd | 14 |
| 2.6.2 Karakterisering av fraktioner | 14 |
| 2.6.3 Karakterisering av uppreningsfraktioner | 14 |
| 2.6.4 Karakterisering med deuteriummärkt dibutylamin..... | 14 |
| 2.6.5 Karakterisering av fraktioner med vätskekromatografi-masspektrometri | 14 |
| 3 Resultat och diskussion | 15 |
| 3.1 Analys av teknisk 4.4-metylendiphenyldiisocyanat med tunnskikt-kromatografi | 15 |
| 3.1.1 Tunnskikt-kromatografi..... | 15 |
| 3.1.2 Derivatens löslighet | 16 |
| 3.2 Tunnskikt-kromatografi-masspektrometri | 17 |
| 3.2.1 Fraktionering av tunnskikt-kromatografi-platta..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2 Extraktion..... | 18 |
| 3.2.3 Utbyte vid extraktion..... | 18 |
| 3.2.4 Upprening med tunnskikt-kromatografi..... | 19 |
| 3.2.5 Derivatisering med olika sekundära aminer | 20 |
| 3.2.6 Derivatisering med deuteriummärkt dibutylamin | 21 |
| 3.3 Masspektrometrisk karakterisering | 22 |
| 3.3.1 Masspektrum av 4.4-metylendiphenyldiisocyanat -dibutylamin | 22 |
| 3.3.2 Bestämning av identifierbar mängd | 22 |
| 3.3.3 Karakterisering av fraktioner..... | 23 |
| 3.3.4 Karakterisering av uppreningsfraktion | 24 |
| 3.3.5 Karakterisering med deuteriummärkt dibutylamin | 25 |
| 3.3.6 Karakterisering av fraktioner med vätskekromatografi-masspektrometri | 27 |
| 4 Slutsatser | 28 |
| 5 Referenser..... | 30 |
| Tack..... | 31 |
| Appendix..... | 32 |

1 Inledning

1.1 Isocyanater

Isocyanater är en ämnesgrupp som innehåller en eller flera isocyanatgrupper (-N=C=O) kopplade till en aromatisk eller alifatisk molekyll. Isocyanatgruppens elektrofila kol gör att de gärna reagerar med nukleofiler som primära och sekundära aminer och alkoholer. Generellt är aromatiska isocyanater mer reaktiva än alifatiska isocyanater.

Då en isocyanat reagerar med en alkohol eller en fenol bildas en uretan.

Polyuretan (PUR) är en av de mest använda plasterna som finns.

PUR har ett brett applikationsområde och används framför allt till produktion av hårda och mjuka skum, men även till lacker, lim, isoleringsmaterial och färg.

Vid produktion av polyuretan (PUR) används difunktionella isocyanater (diisocyanater) och polyfunktionella alkoholer.

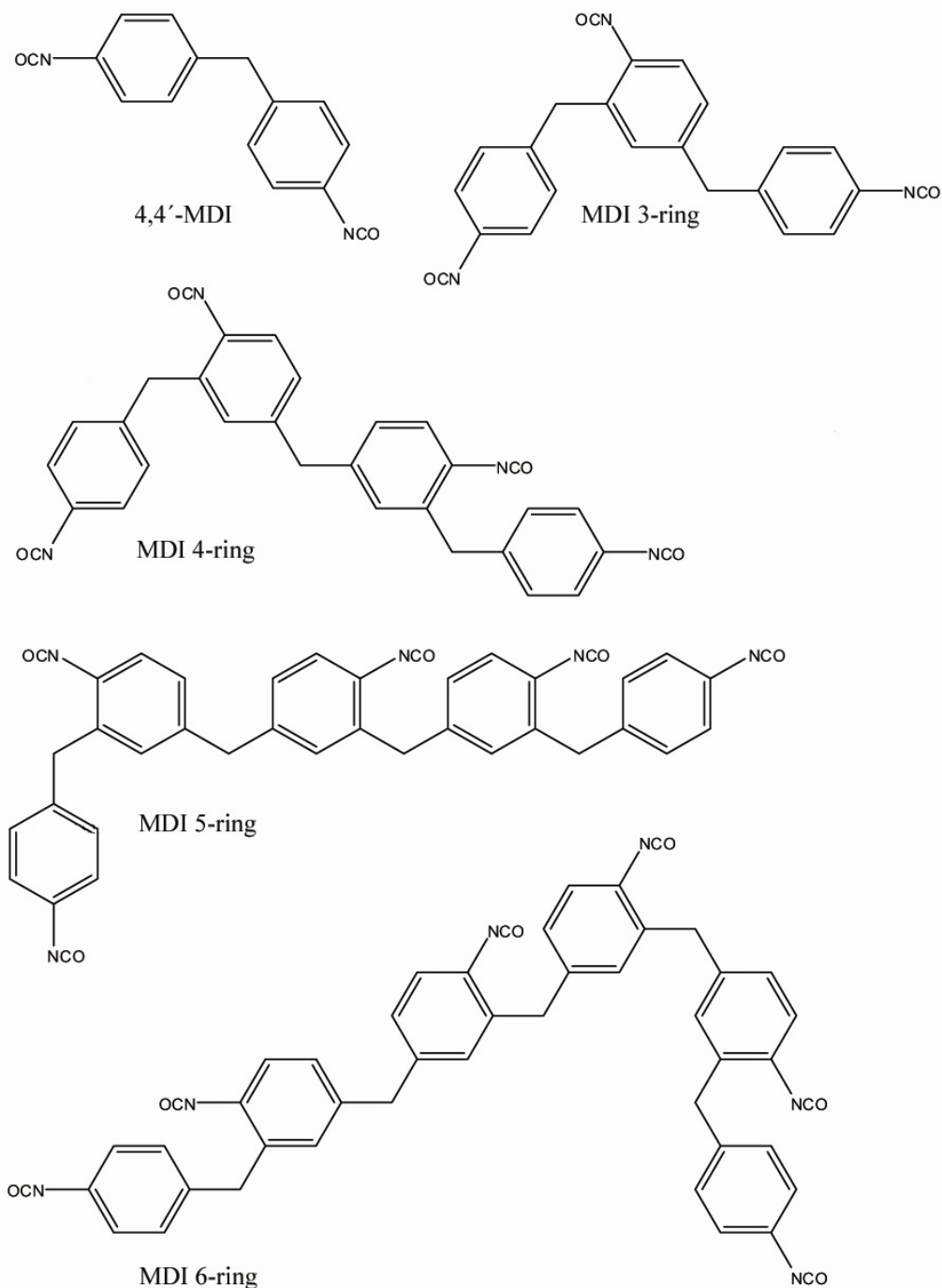
Vid tillverkning av mjuka skum kan vatten tillföras under polymeriseringen varvid isocyanat reagerar med vattnet och ger en amin och koldioxid, vilket ger volym åt skummet. Därför består PUR inte enbart av uretanbindningar mellan isocyanat och alkohol utan även av ureabindningar mellan isocyanat och amin. Polymeriseringsprocessen kan varieras i det oändliga vilket i sin tur gör att PUR kan vara hård, med hög tvärbindningsgrad, såväl som mjuk med linjära flexibla kedjor.

De isocyanater som oftast används för produktion av hårt och mjukt skum är 2.4-, 2.6-toluendiisocyanat (TDI) och 4.4-metylendiphenyldiisocyanat (MDI). TDI används främst för att göra mjukt skum medan MDI används för att göra hårt skum. MDI har börjat ersätta TDI inom många områden eftersom MDI har lägre ångtryck [2]. Detta gör att risken för exponering via inandning minskar. PUR baserade på alifatiska isocyanater används främst till lacker och tvåkomponentsfärger.

I industriella sammanhang används tekniska kvalitéer av MDI (TMDI). Dessa kvalitéer kan innehålla flera varianter av isocyanater såväl som isomerer av MDI och polymeriska varianter av MDI, varvid de ibland även benämns polymerisk MDI (pMDI). Vid rumstemperatur är 4.4'-MDI i form av vita kristaller medan TMDI är en trögflytande brun olja.

TMDI består av många olika isomerer av MDI, med ökande antal isocyanatgrupper (se figur 1).

För MDI är serien väl känd för strukturer bestående av upp till ungefär tolv ringar. Sammansättningen på TMDI varierar, men ungefär 50% av isocyanaterna är MDI monomerer, varav 4,4'-MDI är den mest förekommande [2].



Figur 1: Struktur för 4,4'-MDI och exempel på vanliga oligomerer som kan förekomma i tekniska kvaliteter av MDI.

1.1.1 Exponering och Hälsoeffekter

Exponering för isocyanater sker främst via inandning, men kan även ske genom hudkontakt [3]. Vid framställning av PUR finns uppenbara risker för isocyanatexponering, men risker för exponering finns även då PUR bearbetas under uppvärmning. Runt 150 °C börjar en termiskdegradering av polymeren varvid isocyanater frigörs, både i partikelfas och i gasfas.

Även aminer och aminoisocyanater bildas. En del varianter av dessa är klassade

som cancerframkallande [4, 5]. De vanligaste symptomen vid isocyanatexponering är olika sorters besvär i luftvägarna [6, 7]. Huvudvärk, irriterade slemhinnor och näsblod kan också förekomma. Bronkit och astma kan uppstå vid svåra fall. Höga halter ökar risken, men astma kan utvecklas även vid låga halter och den individuella faktorn tycks vara stor. I Sverige är gränsvärdena för isocyanater 10 ppb för korttidsexponering och 5 ppb för 8 timmarexponering.

1.1.2 Fältmätningar

Eftersom PUR är så vanligt förekommande och exponering kan vara svårt att förutspå är metoder för att kunna mäta isocyanater i arbetsmiljö viktiga. Då inte bara förekomsten av isocyanater utan även aminer och aminoisocyanater är av intresse har metoder för samtidig bestämning utvecklats [8].

Gränsvärdena för isocyanater inom industrin är väldigt låga och det krävs noggranna analysmetoder.

På grund av isocyanaters höga reaktivitet måste de derivatiseras i samband med insamling. Den ideala derivatiseringsreaktionen är snabb, fullständig och ger ett derivat som är stabilt. Derivativering med dibutylamin (DBA) har visat sig uppfylla dessa krav på ett tillfredsställande sätt samtidigt som det ger derivat som lämpar sig väl för detektion med masspektrometri (MS) [8, 9, 10].

Insamling av luftprov måste ske med hänsyn till isocyanater både i gas och i partikelfas. Insamling av isocyanater ske med en impinger där luftprovet finfördelas i en vätska, tex. toluen, innehållande derivatiseringsreagens. Eftersom insamlingen av små partiklar inte är effektiv med impingerflaska används ett glasfiberfilter efter impingern. Filtret väts med derivatiseringsreagens under provtagningen.

Luftburna isocyanater i form av DBA-derivat lämpar sig väl för analys med vätskekromatografi med masspektrometrisk detektion (LC-MS) och detektionsnivåer (LOD) under 1 fmol för såväl MDI, 3-ring-MDI och 4-ring-MDI har rapporterats [11].

1.1.3 Bestämning av isocyanathalten i tekniska kvalitéer

Bestämning av det totala isocyanatinnehållet i tekniska kvalitéer kan göras genom titrering. Till en teknisk kvalité tillförs en känd mängd DBA som resulterar i ett överskott av DBA. Lösningen återtitreras sedan med HCl. Isocyanatinnehållet kan även bestämmas med vätskekromatografi och kemiluminescent kvävedetektion (LC-CLND) [1].

De resultat som erhålls vid kvantifiering av isocyanatinnehållet i en ren 4-4'-MDI lösning med CLND stämmer väl överens med resultaten som fås vid titrering men vid kvantifiering av en TMDI lösning med CLND motsvarar resultaten bara ca 70% av de som fås vid titrering [1].

En anledning till varför man får skilda resultat med de båda metoderna för TMDI skulle kunna bero på löslighetsproblem eller att TMDI innehåller

isocyanater som är extremt svåra att eluera ut i ett reversed phase system. För att undersöka om ett löslighetsproblem förekommer har olika lösningsmedel använts både före och efter derivatiseringen [1].

Resultaten ger ingen skillnad i det totala isocyanatinnehållet mellan olika lösningsmedel. Om det är så att skillnaden beror på att en del av isocyanaterna i en TMDI-lösning är extremt svåra att eluera ut medför det att de kromatografiska metoderna ger resultat där det totala isocyanatinnehållet i TMDI lösningar underskattas.

Kromatografiska metoder med långa körtider och eluering med stor andel organiskt lösningsmedel har prövats utan att några sent eluerade komponenter påvisats [1].

1.2 Syfte

Syftet med arbetet var att karakterisera innehållet i TMDI med avseende på förekomsten av isocyanater som skulle kunna vara svåra att påvisa med traditionella metoder.

Målet är att med hjälp av HPTLC separera innehållet i en TMDI-lösning för att sen med hjälp av MS undersöka förekomsten av större isocyanater.

Metoden riktar sig främst mot TMDI-lösningar derivatiserade med DBA. Om tidigare okända större isocyanater som kan påvisas med denna metod och fragmenten de ger upphov till blir kända, skulle man eventuellt kunna påvisa dem med traditionella metoder.

Arbetet kan delas in i 3 steg.

1. Analys av TMDI med HPTLC.
2. Kombinerad av HPTLC och MS.
3. Karakterisering.

1.3 Analytiska principer och Instrument

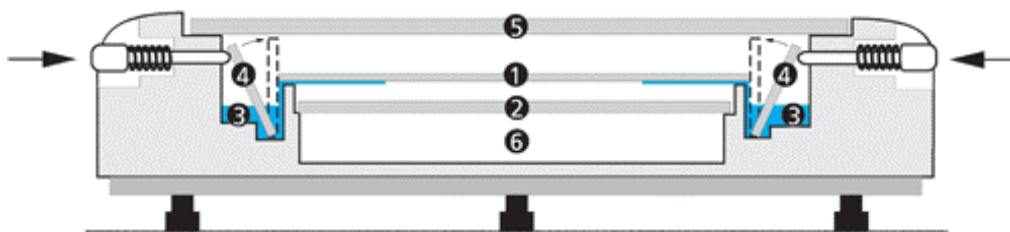
1.3.1 Vätskekromatografi

Kromatografi är en separationsmetod som baseras på fördelning av analyter mellan en stationärfas och en mobilfas. Vid high performance liquid chromatography (HPLC) sitter stationärfasen som ett tunt lager på små partiklar packade i en kolonn medans mobilfasen är en vätska som passerar genom kolonnen. Provet som ska separeras tillförs kolonnen varvid det fastnar på stationärfasen. Då mobilfasen passerar kommer den att ta med sig en del analyter medans andra sitter kvar. Mobilfasen tillförs kontinuerligt och efterhand sköljer den ut (eluerar) provet ur kolonnen. Efter kolonnen sitter en detektor som ger signal när analyterna kommer ut. Vätskekromatografi som använder en opolär mobilfas (tex heptan) och en polär stationärfas (tex bar silika) kallas normalfas (normal phase). Vid omvändfas (reversed phase) använder man en polär mobilfas (tex vatten med organisk modifierare) och en opolär stationärfas (tex någon sorts kolväte). Det är främst ämnens polaritet som avgör elueringstiden. I ett omvändfas system passerar de mest polära analyterna snabbast medans de mer opolära ämnena som upplever starkare attraktion från stationärfasen passerar långsammare genom kolonnen. Organiska lösningsmedel som tex metanol eller acetonitril kan tillföras mobilfasen för att snabbare kunna eluera vissa ämnen eller för att göra separationen mer selektiv. Organiskt lösningsmedel kan tillföras kontinuerligt i konstant mängd eller som en gradient.

1.3.2 Tunnskikt-kromatografi

Precis som övrig kromatografi baseras tunnskikt-kromatografi (TLC) på fördelning av analyter mellan olika faser och i likhet med kolonnkromatografiska metoder kan TLC utföras som normalfas eller omvändfas. Vid TLC är dock stationärfasen immobiliserad på en platta av glas eller aluminium. Prov appliceras på stationärfasen vid plattans kant. Plattan placeras i en vanna och kanten på plattan sätts i kontakt med mobilfasen varvid denna, genom kapillärkrafter, dras igenom stationärfasen. Elueringen avbryts då önskad separation uppnåtts. Under elueringen kommer mobilfasen till viss del att avdunsta och fylla vinnan med ånga vilket ger upphov till en tredje fas. Om mobilfasen och dess ånga inte är i jämvikt under elueringen kommer mobilfasen delvis att avdunsta från stationärfasen. Detta fenomen är mest påtagligt i mobilfasens front och kommer att minska lösningsmedelsfrontens hastighet genom stationärfasen. Vidare kommer stationärfasen framför lösningsmedelsfronten att adsorbera den förångade mobilfasen. Består mobilfasen av flera lösningsmedel kommer dessa att adsorberas i olika utsträckning och ge upphov till en mobilfasgradient. För att minimera inverkan av dessa fenomen finns vanna som utformats dels för att ge minimal kontakt mellan stationärfasen och mobilfasånga och dels för att ge minimal volym åt ångfasen, vilket möjliggör att elueringen kan ske då mobilfasen

är i jämvikt med sin ånga. En variant på vanna som tar hänsyn till dessa faktorer är "Horizontal developing chamber" utformad av Camaag (se figur 2).



Figur 2: En vanna utformad med minimal volym samt minimal kontakt mellan stationärfas och mobilfasånga. Denna variant är en "Camaag, Horizontal developing chamber".

Medan HPLC-metoder separerar analyter i tid separerar TLC-metoder analyter i rum. En fördel med det är att när separationen väl är utförd så sitter analyterna kvar på plattan vilket möjliggör användandet av flera sorters detektion så länge de är ickedestruktiva. Vidare kan mobilfas väljas med större frihet eftersom den avlägsnas innan detektion.

Även som uppreningsmetod är TLC en enkel teknik. Extraktionen av analyter från stationärfasen är dock ett kritiskt moment. Lösningsmedel för extraktionen kan väljas med stor frihet, men metanol brukar undvikas på grund av den höga lösligheten av kisel i metanol. Då stor provkapacitet önskas används preparativa plattor med tjockare stationärfas, vilket möjliggör separation av upp till 1 g prov. Provkapaciteten ökar i grova drag proportionellt med kvadratroten av lagertjockleken. Det tjockare lagret ger ofta lägre upplösning vilket gör att TLC-plattor med tunt lager stationärfas föredras då provkapaciteten inte är kritisk.

Vid high performance thin layer chromatography (HPTLC) används plattor där stationärfasen är tunnare och utgörs av partiklar av mindre storlek. De generella skillnaderna mellan TLC och HPTLC kan ses i figur 3.

| | HPTLC | TLC |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Partikelstorlek | 5-6 μm | 10 - 12 μm |
| Partikelstorleks variation | 4 - 8 μm | 5 - 20 μm |
| Lagertjocklek | 200 μm | 250 μm |
| Bottenthöjden | 12 μm | 30 μm |
| Elueringssträcka | 3 - 6 cm | 10 - 15 cm |
| Elueringstid | 3 - 20 min | 20 - 200 min |
| Provvolyum | 0.1 - 0.5 μl | 1 - 5 μl |
| Detektionsgräns (absorption) | 100 - 500 pg | 1 - 5 ng |

Figur 3: Generell jämförelse mellan HPTLC och TLC.

Fördelar med TLC/HPTLC är att metoderna är snabba, billiga och relativt lätta att optimera. Vidare, eftersom stationärfasen bara används en gång behöver risken att kontaminera stationärfasen med svåreluerade analyter inte beaktas, vilket i vissa avseenden ställer mindre krav på provupparbetning.

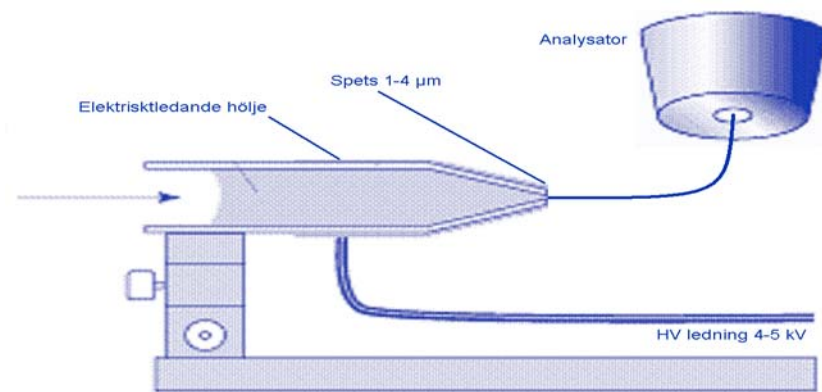
1.3.3 Masspektrometri

Masspektrometri (MS) är en analytisk metod för att separera och detektera joner utifrån deras masstal. Masstalet för en jon är kvoten mellan dess massa och laddning.

En masspektrometer är en massflödeskänslig detektor som är väldigt mångsidig då den både kan användas för identifiering av okända substanser, kvantifiering, bestämning av isotopsammansättning för grundämnen och för att ge strukturell information.

En masspektrometer består av en jonkälla, analysator och en detektor. Till detta arbete har en quadropol masspektrometer använts med elektropray jonisation (ESI) (se figur 4) och detektion av positiva joner.

Jonkällan är den delen av masspektrometern där joniseringen sker. Eftersom masspektrometern fodrar vakuum för att fungera utgör den stora volymökning som uppkommer vid förångning av mobilfas problem. Därför behövs det en metod för att förångna provet och avlägsna lösningsmedlet innan provet och mobilfas införs i masspektrometern.



Figur 4. Schematisk bild över elektroprayjonisation interface.

Vid ESI sprayas provet ut från en metallkapillär under hög spänning (3-5 kV). Den höga spänningen, som kan vara positiv eller negativ beroende på analyten, gör att provet lämnar kapillären som en fin aerosol. På grund av spänningen som ligger över kapillären blir laddningsfördelningen i dropparna ojämn. Aerosolen sprayas ut tillsammans med varm kvävgas vilket underlättar avdunstningen av lösningsmedel från dropparna i aerosolen. Efterhand som dropparna minskar ökar den repellerande kraften mellan analyterna, som finns i jonform i droppen, varvid den splittras genom en serie mekanismer.

Jonerna dras mot två elektroder (Nozzle och Skimmer) med konformade hål och in i masspektrometern via det undertryck som råder.

ESI är en mild joniseringsteknik. Eftersom den till viss del är beroende av att analyterna kan protoneras eller deprotoneras spontant lämpar sig metoden inte för väldigt opolära analyter. Om analyterna är väldigt opolära måste analyternas kemiska miljö då de når metallkapillären beaktas. För att underlätta analyternas jonisering kan tex lösningsmedlet innehålla små mängder av en syra eller bas. För effektiv aerosolbildning är flyktiga lösningsmedel med låg ytspänning att föredra.

Flerladdade joner bildas ofta med ESI vilket även möjliggör noggrannare massbestämning för större molekyler.

Från jonkällan transporteras analyterna via ett elektriskt fält till analysatorn. Quadrupol är den vanligaste analysatorn i masspektrometrar idag. Den består av parallella metallstavar som ges statisk och oscillerande spänning. Då jonerna når quadrupolen kommer de att få en vågrörelse. Beroende på jonernas masstal kommer de att få olika rörelse. Joner vars masstal är sådant att resonans uppkommer kommer att få en jämn vågrörelse genom quadrupolen medans icke-resonanta joner får avvikande rörelse, slår i quadrupolens stavar, neutraliseras och aldrig når detektorn. Genom att variera spänningen kan joner med olika masstal tillåtas nå detektorn. En quadrupol kan generera 2-8 spectra per sekund och kan hantera masstal upp till 4000. Quadrupolmasspektrometrar ger konstant upplösning vilket innebär att joner med masstalen 100 och 101 separeras från varandra i samma utsträckning som joner med masstalen 500 och 501.

En av quadrupolens nackdelarna är dålig känslighet vid höga masstal.

Slutligen når jonerna detektorn som, beroende på konstruktion, genererar en signal när en jon träffar eller passerar förbi en yta på detektorn. För att förstärka den svaga signalen en jon ger används en elektronmultiplikator av något slag som gör att varje jon som påverkar detektorn ger upphov till en kaskad av elektroner.

Masspektrometern kan konfigureras på olika sätt. Vid scanning varieras quadrupolens fält så att joner inom ett bestämt masstalsområde successivt når detektorn. En scanningscykel kan ta 10 ms upp till 5 sekunder beroende på hur stort masstalsområde som scannas och uppehållstiden vid varje masstal. Full scanning ger registrering av alla joner och benämns "total ion current" (TIC). Ställs masspektrometern in på "selected ion monitoring" (SIM) tillåts bara utvalda masstal nå detektorn. Vid övervakning av utvalda joner möjliggörs längre uppehållstid vid varje masstal och i sin tur lägre detektionsnivåer. Vid "multiple reaction monitoring" (MRM) fodras ett MS/MS-system. MRM kan betraktas som två SIM i serie. Först urskiljs joner av ett visst masstal (parention), som sedan genomgår vidare fragmentering via kollision med argongas. Av de bildade fragmenten är det bara de med ett bestämt masstal (daughterion) som tillåts nå detektorn. MRM är mer selektiv än SIM.

2 Material och metod

2.1 Apparatur

2.1.1 Tunnskiktskromatografi

Applicering av prov gjordes med Automatic TLC sampler 4 (Camag, Muttenz, Schwizerland) på Kiselgel 60 plattor (Merck, Darmstadt, Tyskland) och TLC separationen utfördes i en Horizontal developing chamber (Camag).

Scanning av plattorna gjordes med en TLC scanner 3 (Camag) med parametrar enligt tabell 1, Appendix.

2.1.2 Vätskekromatografi-Masspektrometri

Masspektrometern som användes var en Quattro LC tandem MS (Waters, Altrincham, Cheshire, UK). Masspektrometern var inställd för att mäta positiva joner genom elektropray jonisation (ESI⁺). En micro-LC pump Shimadzu LC10ADVP (Shimadzu Coporation, Kyoto, Japan) användes. Genomgående användes en mobilfas sammansatt av A: 5/95 ACN/H₂O+0,05% myrsyra och B: 95/5 ACN/H₂O+0,05% myrsyra med en gradient enligt tabell 2, Appendix.

Kolonnen som användes var en Xterra[®] C₁₈, 50mm × 1,0 mm med 2,5 µm particklar (Waters, Massachusetts, USA). Proven injicerades som en centrerad 2,5 µl plugg i en 20 µl loop med LC-PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Provfokuseringsvätskan utgjordes av vatten.

Vid ett par försök användes dessutom en sprutpump (Harvard apparatus Holliston Massachusetts USA) samt en extra LC pump Shimadzu LC-9A som kopplades in efter kolonnen.

2.2 Kemikalier

Metanol av Lichrosolv renhet (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Etylacetat av HPLC renhet (Labscan Ltd, Dublin, Irland)

Toluen av pro analysi renhet (Merck)

Heptan av HPLC renhet (Labscan Ltd)

THF av pro analysi renhet (Merck)

Acetonitril av Lichrosolv renhet (Merck)

Dibutylamin (DBA) för syntes (Merck-schuchardt, Hohenbrunn, Tyskland)

Dipropylamin (DPA) för syntes (Merck-schuchardt)

Dietylamin (DEA) för syntes (Merck-schuchardt)

2.3 Provlösningar

Provlösning A: TMDI, 0,52mg/ml med avseende på 4-4'-MDI derivatiserad med DBA i toluen och efter indunstning till torrhet återlöst i metanol.

Provlösning B: Internstandardlösning, TMDI 3,84 mg/ml derivatiserad med deuterium märkt DBA (D₁₈-DBA) i toluen och efter indunstning till torrhet återlöst i metanol.

2.4 Analys av teknisk 4.4-metylendiphenyldiisocyanat med tunnskiktskromatografi

2.4.1 Tunnskiktskromatografi

Samtliga HPTLC-plattor som användes tvättades i 5 minuter i metanol.

Plattorna torkades i dragskåp i 1 timme innan användning.

För att bestämma lämpliga appliceringsvolymeter och provlösningsskoncentrationer applicerades olika volymer av en spädningsserie av provlösning A.

Appliceringspositionen valdes 5 mm in på plattan för små provvolymeter och 10 mm in på plattan för större provvolymeter. Provlösningen applicerades i smala band vars längd också varierades.

Lämplig mobilfas, för separation av innehållet i en TMDI lösning, bestämdes experimentiellt, med utgång från en mobilfas av etylacetat och heptan (1:1).

Tiden för TLC separation varierades mellan 5 och 15 minuter.

Efter separation fick plattorna torka 15 minuter i dragskåp innan scanning.

2.4.2 Derivatens löslighet

Eftersom det är av yttersta vikt att isocyanatinnhållet inte underskattas pga löslighetsproblem gjordes nya derivatiseringar av TMDI med DBA i olika lösningsmedel. Syftet var att undersöka om en topp som uppstår på appliceringspunkten, som antas vara av intresse blir märkbart större om annat lösningsmedel används. TMDI vägdes upp i 2 provrör. Till det innehållande 18 mg tillfördes toluen (2ml) och till det innehållande 27 mg tillfördes THF (2 ml). Vardera provrör tillfördes 100 µl DBA därefter placerades de i vortex. Från provet löst i toluen överfördes 1 ml till nytt provrör som sen placerades i indunstare för indunstning till torrhet. Provet återlöstes därefter i 1ml metanol. De tre proven späddes 100 ggr och av dessa lösningar applicerades 2 µl på 4 mm breda band. Proverna eluerades under 8 minuter med en mobilfas av etylacetat, toluen, heptan (4:3:3).

Plattan scannades enligt standard parametrar.

2.5 Kombinerad av tunnskikt-kromatografi och masspektrometri

2.5.1 Fraktionering av tunnskikt-kromatografi-platta

För att undersöka hur isocyanaterna fördelas över plattan och för att identifiera topparna gjordes ett HPTLC-MS kromatogram. Av provlösning A applicerades 20 µl i ett 80 mm långt band 5 mm ifrån plattans kant. Provet eluerades under 15 minuter i en mobilfas av etylacetat, toluen och heptan (4:3:3). Separationen kontrollerades genom scanning. Då separationen verifierats skrapades stationärfasen av från plattan i 2,5 mm breda fraktioner med en skruvmejsel. 22 fraktioner skrapades. Varje fraktion överfördes till provrör.

2.5.2 Extraktion

Till provrören innehållande den avskrapade stationärfasen tillfördes 12 ml etylacetat. För att påskynda extraheringen placerades fraktionerna på skak i 5 minuter följt av ultraljudsbad i två omgångar á 20 minuter med omrörning i vortex däremellan. Proverna centrifugerades 10 minuter vid 3000 varv/minut i en C312 (Jouan, Saint. Herblain, France) sedan överfördes suspensionen kvantitativt till nya rör och lösningen indunstades till torrhet med en speed vac plus Sc210A (Savant. Instruments Inc., Holbrook, NY, USA). Proverna återlöstes i 1 ml metanol och placerades i ultraljudsbad i 10 minuter.

2.5.3 Utbyte vid extraktion

För att kontrollera utbytet applicerades 100 µl av provlösning A. Separationen utfördes under 10 minuter i en mobilfas av etylacetat. En 5 mm bred fraktion skrapades 52-57 mm in på plattan vilket svarade mot positionen för en stor topp som antogs innehålla MDI och större delen av dess ringserie. Fraktionen extraherades och återlöstes i 5 ml metanol.

Till 50 µl av denna lösning tillfördes 0,50 µg internstandard i form av provlösning B. Standardlösningar bereddes enligt tabell 3, Appendix och tillfördes vardera 0,50 µg internstandard.

Provet och standardlösningarna analyserades med LC-MS enligt parametrarna i tabell 4 Appendix.

Flödet från LC-pumparna var 0,100 ml/min (Pump A 0,040 ml/min, Pump B 0,060 ml/min). Masspektrometern användes med parametrarna enligt tabell 5, Appendix.

2.5.4 Upprening med tunnskikt-kromatografi

Eftersom isocyanaterna som antas finnas i den första toppen verkar vara sparsamt förekommande i förhållande till 4-4'-MDI fodras stora appliceringsvolymer av en relativt koncentrerad lösning. Ett försök som i det närmaste kan betraktas som preparativ TLC gjordes. Syftet var att avlägsna 4-4'-MDI och dess ringserie så att

en fraktion fri från dessa skulle kunna skrapas för att sen analyseras i masspektrometern.

En provlösning av TMDI (ca 3,3 mg/ml) upparbetades med utgång från provlösning A och 100 µl av denna applicerades. Provet eluerades under 10 minuter med en mobilfas av etylacetat.

Tre fraktioner skrapades: nummer 1a; på appliceringspunkten, nummer 2a; mitt på plattan och nummer 3a; i fronten. Fraktionerna överfördes till tre provrör och extraherades. Efter indunstning till torrhet återlöstes proven i 1,0 ml metanol.

2.5.5 Derivatisering med olika sekundära aminer

TMDI derivatiserades med olika sekundära aminer med förhoppningen att kunna göra ett prov som motsvarade det som erhöles från fraktion nummer 1 vid uppreningsförsöket (2.5.4) fast derivatiserat med DPA istället. Detta spektrum skulle då eventuellt kunna bistå i karakterisering av ämnena i toppen vid appliceringspunkten.

Tre provrör fylldes med 2 ml THF. Vidare tillfördes provrören 9 mg, 24 mg respektive 32 mg TMDI samt 200 µl av DBA, DEA respektive DPA. Proven blandades försiktigt i vortex och spädades 10 ggr.

Av respektive spädning applicerades 1 µl i 4 mm långa band. Proverna eluerades i 10 minuter med en mobilfas av etylacetat och toluen 4:6.

2.5.6 Derivatisering med deuteriummärkt dibutylamin

Provlösning B applicerades (100 µl). Separation utfördes under 10 minuter i mobilfas av etylacetat. Tre fraktioner skrapades, 1b, 2b och 3b valda på samma sätt som under 2.5.5. Fraktionerna extraherades och återlöstes i 1 ml metanol. Blankprov gjordes genom att 100 µl THF applicerades på en separat platta som vidare genomgick samma provberedning som provlösningarna.

Blankprovet bereddes främst för att se vilken signal det gav i masspektrometern, men undersöktes ändå med scanner för att kontrollera att provet verkligen var blankt och ingen kontamination förekommit.

2.6 Masspektrometrisk karakterisering

2.6.1 Bestämning av identifierbar mängd

För att få en uppfattning om minsta identifierbara mängd för kombinerad HPTLC-MS applicerades användes fraktionen som beredes under 2.5.3. Detta prov injicerades på masspektrometern via en 10 μ l loop med ett flöde på 0,050 ml/min. (Pump B 0,045 ml/min, Pump A 0,050 ml/min) som kombinerades, efter kolonnen, med ett flöde från en sprutpump (1,6 ml) innehållande 0,5% myrsyra. Masspektrometern användes med parametrarna enligt tabell 6, Appendix. Provet scannades över området 100-2500 u med cykeltiden 3,100 s och scanningstiden 3,00 s. Signal/brus-förhållande uppskattades.

2.6.2 Karakterisering av fraktioner

De 22 extraherade fraktioner som bereddades under 2.5.1 injicerades på masspektrometern via en 10 μ l loop enligt samma arrangemang som beskrivs under 2.6.1. Masspektrometern var inställd på SIR med 7 kanaler, samtliga med dwell tiden 0,03 s, se tabell 7, Appendix. Fraktionerna undersöktes även genom "neutral loss" och "parents of" för masstalen 130 och 156. Kollisionsgasenergin var 15 eV och masstal från 500 till 3000 inkluderades.

2.6.3 Karakterisering av uppeningsfraktioner

Prov 1a och 2a injicerades på masspektrometern på samma sätt och med samma parametrar som beskrivs under 2.6.1 och scannades över området 100-2500 u med cykeltiden 3,100 s och scanningstiden 3.00 s. Fraktion 3a späddes 300 ggr innan de injicerades och analyserades på samma sätt.

2.6.4 Karakterisering med deuteriummärkt dibutylamin

Fraktionerna 1b och 2b analyserades genom direkt injicering på masspektrometern på precis samma sätt som fraktion 1a och 2a. Efter jämförande av de erhållna spektrummen analyserades prov 1a med masspektrometern inställd på SIR enligt tabell 8, Appendix.

2.6.5 Karakterisering av fraktioner med vätskekromatografi-masspektrometri

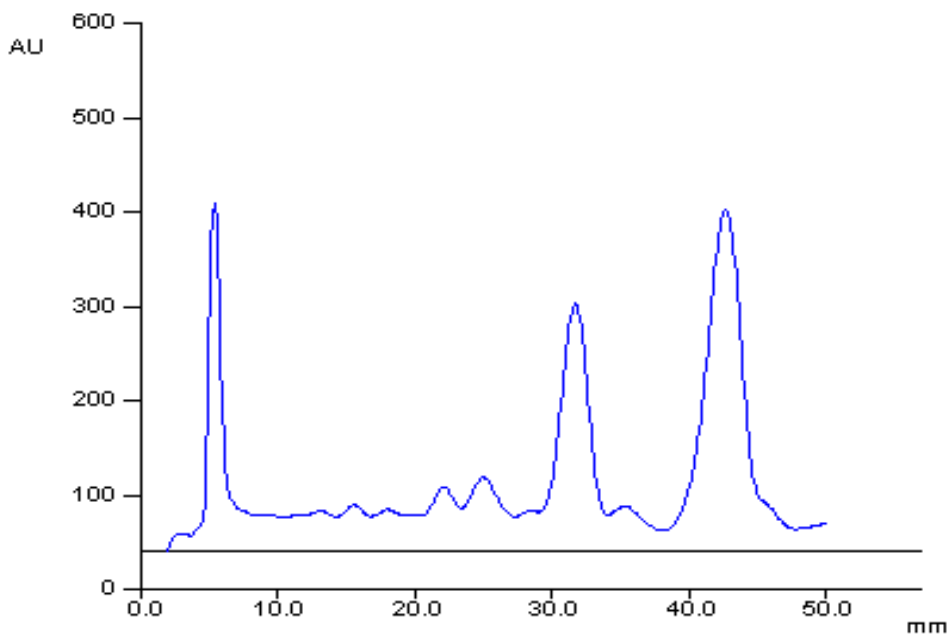
Fraktion nummer 1a och 1b analyserades med LC-MS. Även innehållet i blanken analyserades på detta sätt. En mobilfasgradient användes (se tabell 2, Appendix). Flödet från kolonnen sammanfördes med flödet (20 μ l/min) från en extra pump (Shimadzu LC-9A) som tillförde en vattenblandning (95/5 H₂O/ACN) för att underlätta jonisationen i masspektrometern. Masspektrometern var inställd på SIM med samma kanaler som i förgående försök för prov 1a och masstalen i tabell 9, Appendix, för prov 1b. Försöket upprepades sedan med masspektrometern inställd på scanning över området 100-2500 u.

3 Resultat och diskussion

3.1 Analys av teknisk 4,4-metylendiphenyldiisocyanat med tunnskikt-kromatografi

3.1.1 Tunnskikt-kromatografi

Lagom retention uppnåddes med en mobilfas av etylacetat, heptan och toluen (4:3:3). Tio minuters separationstid blev de tider som användes för TLC separation, då ett överskådligt kromatogram önskades (se fig 6).



Figur 6: Screening av en TMDI lösning, provlösning A. Mobilfasen bestod av etylacetat, heptan och toluen(4:3:3).

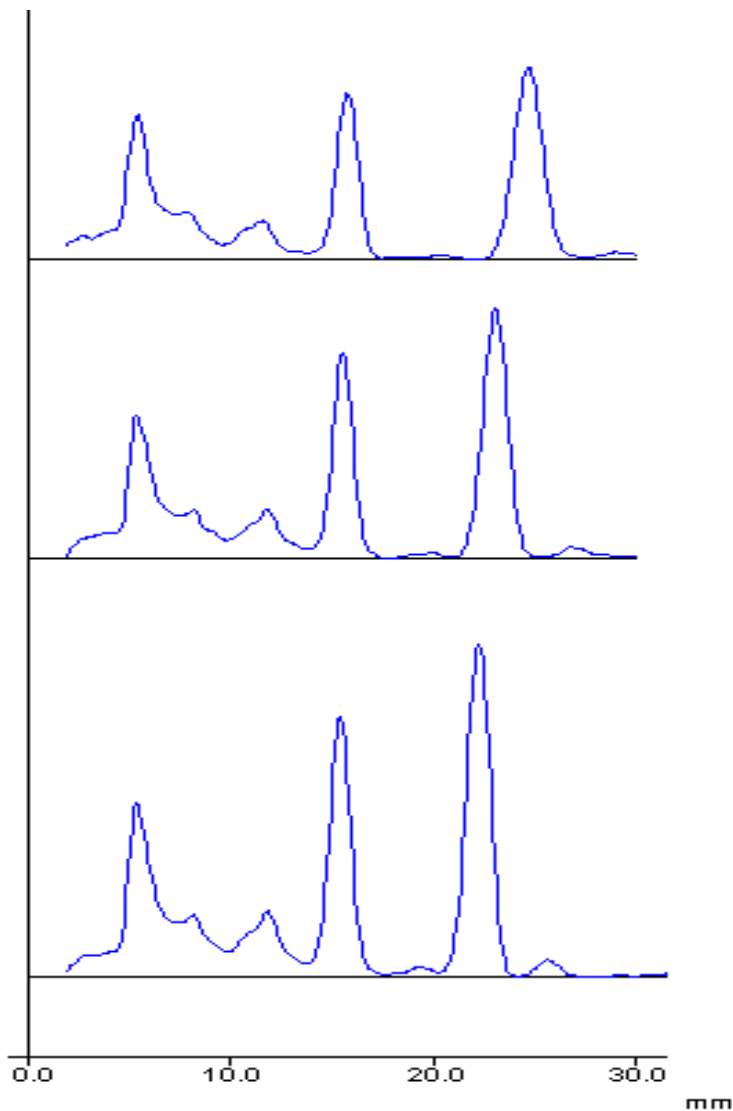
Y-axeln: Absorbans, X-axeln: position på TLC plattan.

Hur mycket som kan appliceras på en platta utan att den blir överladdad beror givetvis på hur långt och smalt det applicerade bandet är. Det visade sig att av en TMDI (33 µg/ml) lösning kan ungefär 10 µl appliceras utan att kromatografin blir lidande, om volymen fördelas på ett 4 mm långt band. Ett sätt att tolka detta är att ungefär 0,08 µg kan appliceras per millimeter platta. Den angivna mängden avser dock 4-4'-MDI och inte den totala analytmängden.

Scanningen avslöjade att det på appliceringspunkten fanns en relativt stor topp som inte rörde sig. Det ansågs inte troligt att denna härrörde från större komponenter i den ringserien som MDI ger eftersom de större ringstrukturerna, som har hög retention, är mycket sparsamt förekommande [2]. Toppen skulle till stor del kunna utgöras av prepolymeriserade fragment. Huruvida den innehöll isocyanater som genomgått derivatisering med DBA var oklart. Att toppen kom från den tekniska lösningen och inte var någon form av interferens stod dock klart, eftersom det på en och samma platta hade applicerats flera spår av spädningsserien där toppens storlek följde seriens utveckling.

3.1.2 Derivatens löslighet

Det fanns förhoppningar om att THF skulle vara bättre på att lösa större isocyanater som annars är svårlösliga, men bortsett från att THF lösningen var något mer koncentrerad uppvisade de erhållna kromatogrammen ingen tydlig skillnad med avseende på löslighet. Hade lösligheten för ämnena i den första toppen varit märkbart större i THF skulle det ändra proportionerna mellan den toppens area och de övriga i kromatogrammet. Viss skillnad i löslighet finns det säkert och flera försök skulle kunna utföras för att undersöka detta närmare, men dessa resultat räckte för ändamålet. Med lite ansträngning kan man ana lite sämre upplösning för provet löst i metanol (se figur 7). Detta skulle kunna bero på att metanol har relativt hög elueringsstyrka på bar kisel.



Figur 7: Jämförelse av olika derivatiseringslösningar och prov lösningar. Överst: Metanol, Mitten: Toluen, Nederst: THF. Areaförhållandet mellan den första toppen och de övriga är det samma oberoende av lösningsmedel.

3.2 Tunnskiktskromatografi-masspektrometri

3.2.1 Fraktionering av tunnskiktskromatografi -platta

Scanningen av plattan visade på god separation (se fig 8).

För att underlätta skrapningen valdes 15 minuters TLC separationstid. Detta ger lite mer bandbreddning, men det underlättade skrapningsproceduren. Dessutom kan upplösningen i det slutliga HPTLC-MS-kromatogrammet ändå inte bli bättre än 2,5 mm.

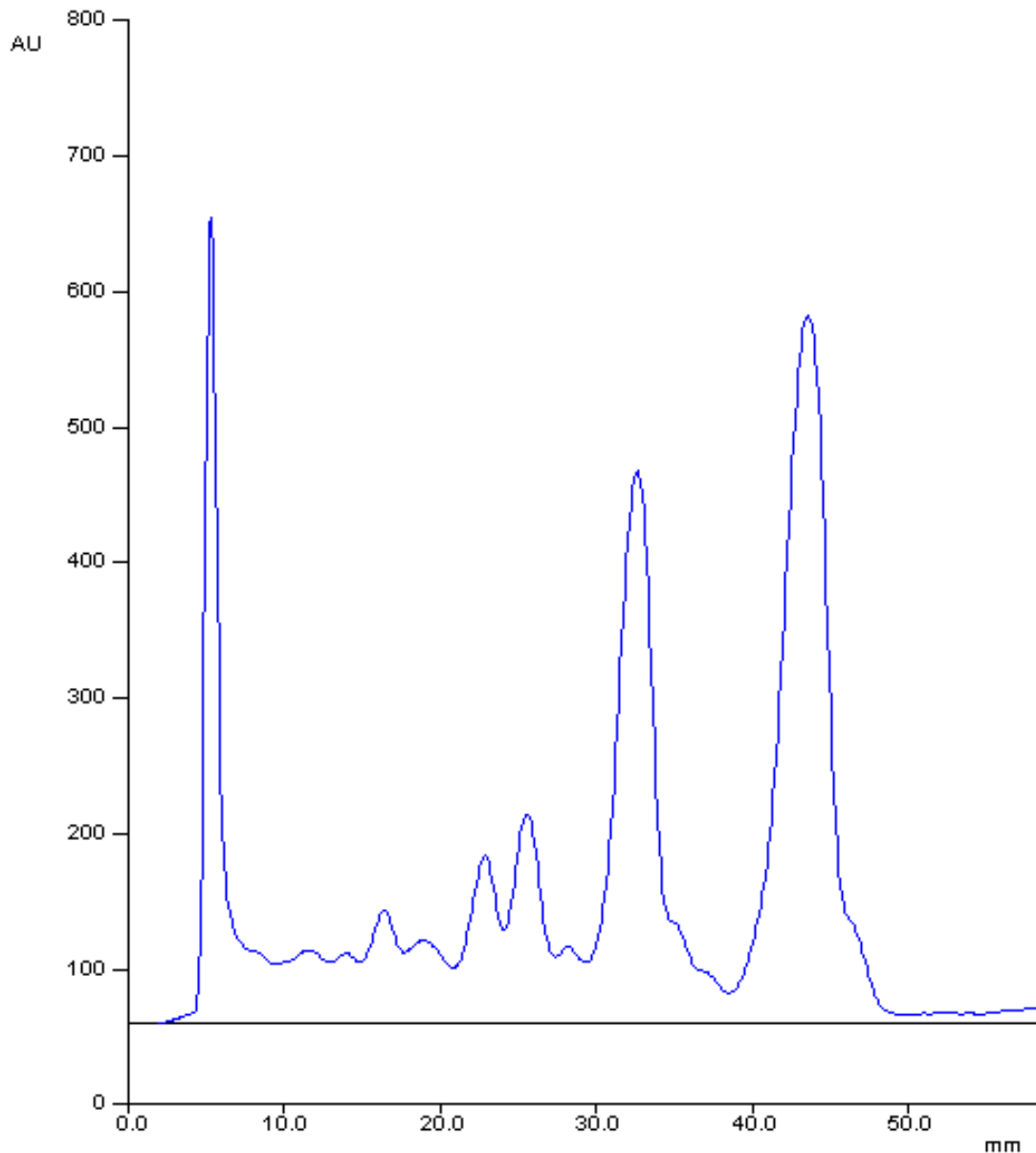


Fig 8: Scanning av plattan som användes vid interfacingförsöket. Provlösning A separerades under 15 minuter i en mobilfas av etylacetat, heptan och toluen (4:3:3). Y-axeln: Absorbans, X-axeln: position på TLC plattan.

3.2.2 Extraktion

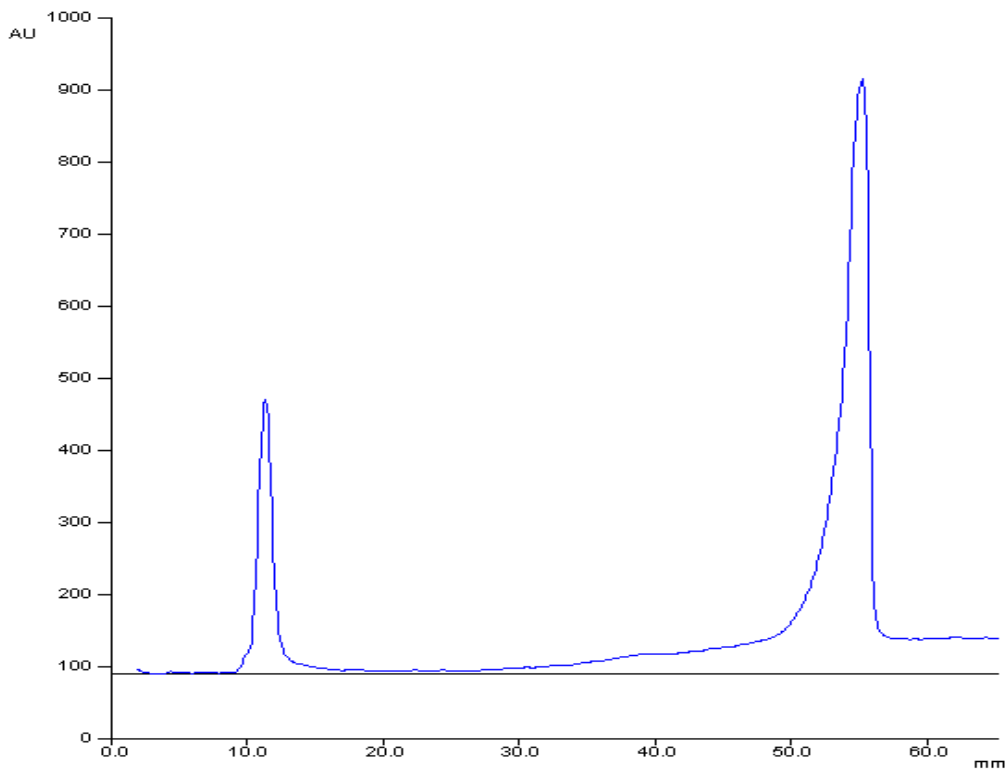
Inledningsvis utfördes extraktionen utan grundligare provberedning och med små volymer extraktionslösningsmedel. Då detta resulterade i dåligt utbyte utfördes extraktionen enligt beskrivningen under 2.5.2, vilket gav betydligt bättre resultat. Det är dock oklart om utbytet förbättrades pga längre extraktionstid i ultraljudsbad, större lösningsmedelsvolymer eller en kombination av dessa.

3.2.3 Utbyte vid extraktion

Med en mobilfas av etylacetat erhöles en relativt smal topp som innehöll större delen av ringserien (se fig 9).

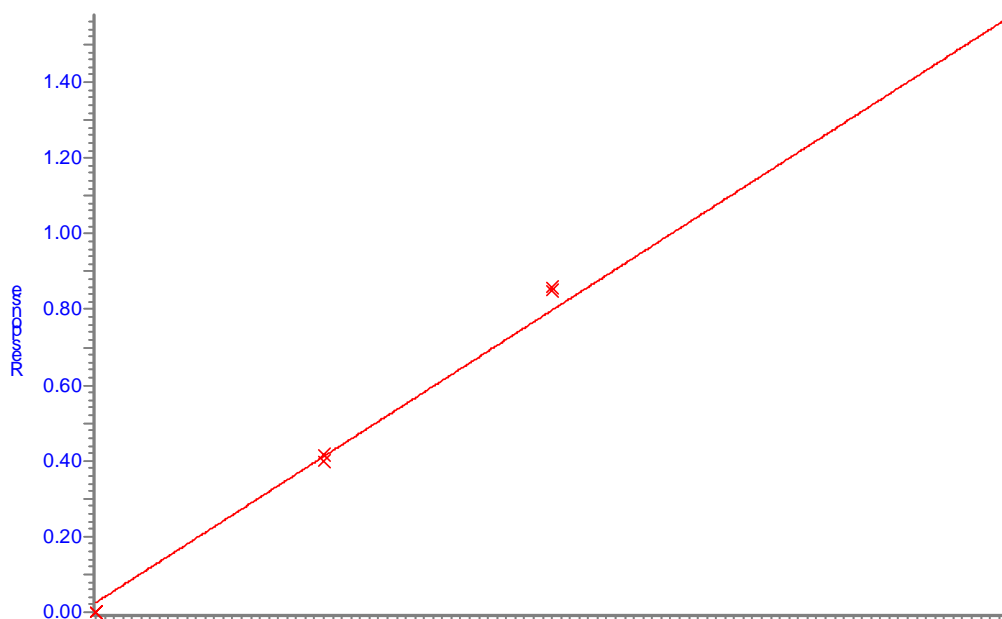
Kalibreringskurvan för 4,4'-MDI kan ses i figur 10.

Utbytet blev bra men det står klart att försöket håller ett positivt fel eftersom utbytet för 4-4'-MDI blev över 100 % (se figur 11). Det beräknade utbytet baseras på en extraktion och reproducerbarheten i extraktionen undersöktes inte, men resultatet tyder ändå på att extraktionsmetoden fungerar.



Figur 9: Kontroll av utbyte. Området 52-57 mm användes för extraktion.

Compound name: 4,4-MDI
 Correlation coefficient: $r = 0.998236$, $r^2 = 0.996475$
 Calibration curve: $1.5454 \cdot x + 0.0248803$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Figur10. Kalibrerings kurva för 4-4'-MDI vid bestämning av utbytet.

Utbytet minskade med ökad antal ringar i serien. Den minskade lösligheten för större ringstrukturer skulle kunna vara en bidragande faktor. I detta fall blir utbytet dessutom sämre för 3-ring och 4-ring pga att dessa förekommer som isomerer vilket gör att dessa sprids mer över TLC-plattan och gör dessa svåra att skrapa.

| Ämne | Utbyte [%] |
|----------|------------|
| 4-4'-MDI | 101 |
| 3-Ring | 94 |
| 4-Ring | 73 |

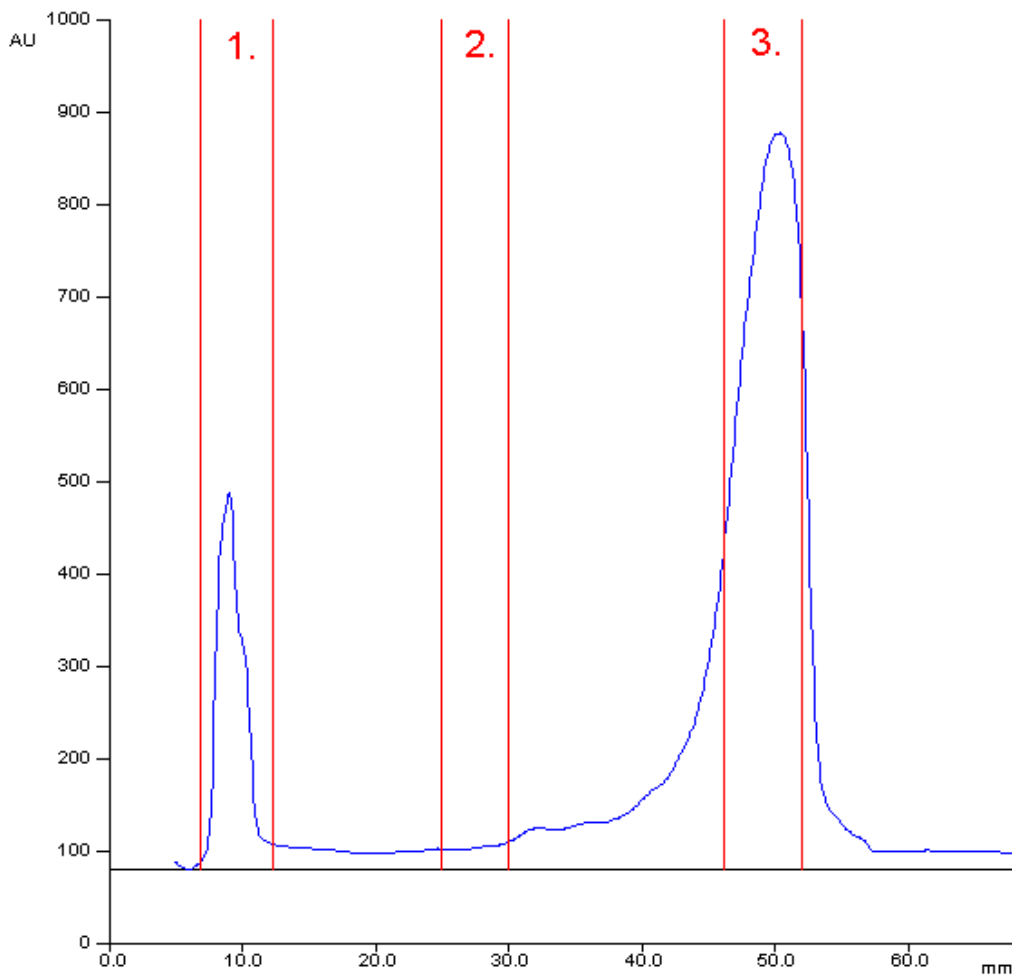
Figur 11: Utbyte vid extraktion. Beräkningarna är baserade på en enstaka extraktion.

3.2.4 Upprening med tunnskikt-kromatografi

Plattorna som användes var inte avsedd för preparativt bruk och den tillåtna koncentrationen på provlösningen var därför aningen begränsad för att inte alltför kraftig överladdning skulle uppkomma. 100 µl av TMDI (ca 3,3 mg/ml) gav tillräcklig mängd för vidare upprening samtidigt som acceptabel kromatografi bibehölls. Eluering med etylacetat gav en relativt väl isolerad topp på appliceringspunkten (se figur 12). Från detta område 7-12 mm bereddtes fraktion nummer 1a.

Det var intressant att se att den första toppen inte alls rör sig från appliceringspunkten vid eluering med etylacetat. Vidare försök visade att vissa analyter i toppen elueras då metanol tillförs mobilfasen.

Då det ansågs lämpligt att först få en överskådlig inblick i toppens innehåll fästes ingen större vikt vid, att i detta skede, använda en mobilfas som gav den separationen. Fraktion nummer 2a tog från 25-30 mm för att kunna kontrollera separationen och se hur utspritt 4-4'-MDI var över plattan. Fraktion 3a togs i området 47-52 mm.



Figur 12: Upprening av TMDI. Ett koncentrat av provlösning A eluerades med en mobilfas av etylacetat. Fraktioner skrapades av på tre ställen markerade 1,2 och 3 i figuren.

3.2.5 Derivatisering med olika sekundära aminer

Ju kortare kolkedjör aminen hade desto högre retention fick derivaten. Detta ansågs fullt logiskt, men det var intressant att se att retentionen påverkades så starkt beroende på vilken sekundär amin TMDI derivatiserades med (se figur 13). Dessvärre medförde den kraftigt förändrade retentionen att det blev mycket svårt att få fram fraktioner som var fullt jämförbara med fraktion 1a.

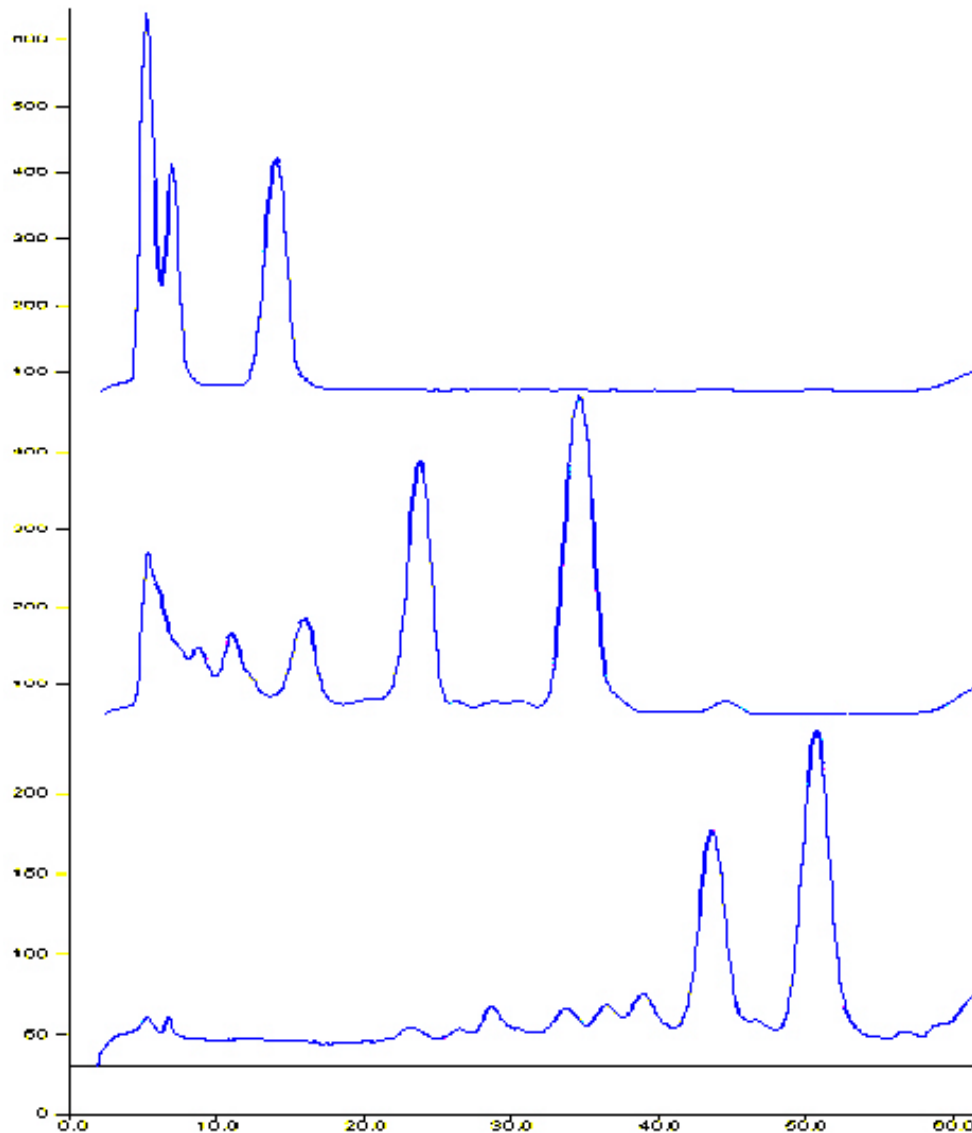


Fig13: Derivatisering av TMDI med olika aminer. Retentionen påverkas starkt av valet av amin. Proverna eluerades under 10 minuter med en mobilfas av etylacetat och toluen (4:6). Överst: DEA-TMDI. Mitten: DPA-TMDI. Nederst: DBA-TMDI.

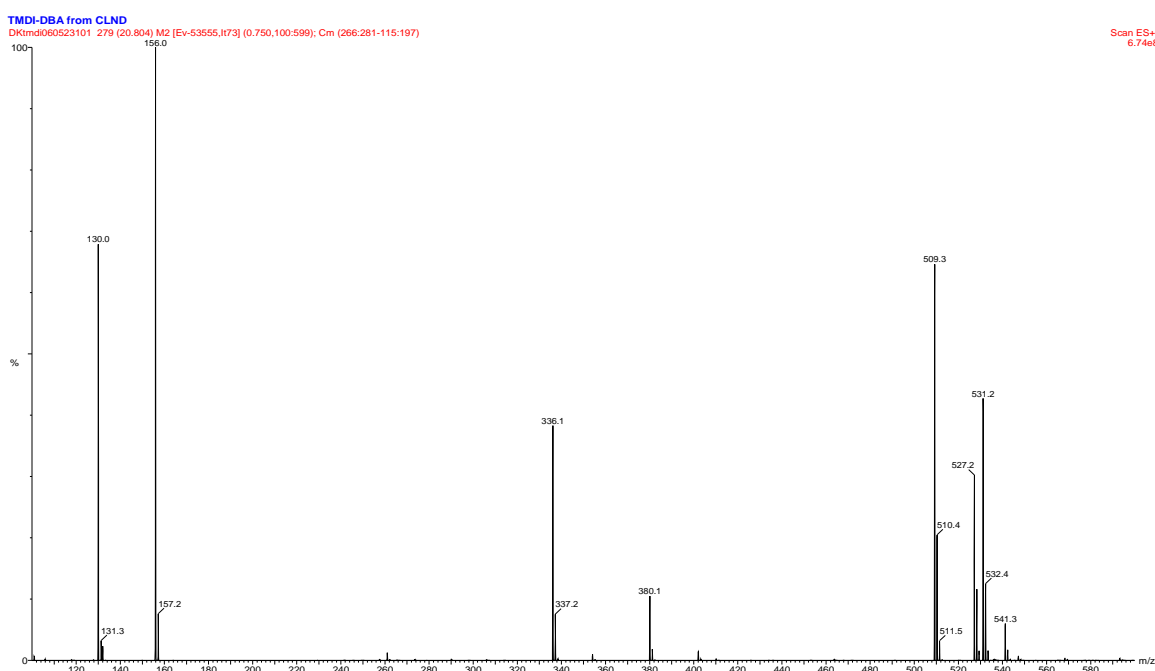
3.2.6 Derivatisering med deuteriummärkt dibutylamin

Scanning av plattan visade att separationen inte var identisk med den som erhöles vid tidigare upprepningsförsök med derivat av vanlig DBA. Kromatogrammet som erhöles var förvånansvärt fint med tanke på den höga analytkoncentrationen som fanns på plattan. Den främsta anledningen till att separationen var föga reproducerbar antas vara att provlösningarna inte var fullt jämförbara och inte hade samma koncentration. Vidare verkar det som om den stora analytmängden gör separationen mer känslig för relativt små variationer i stationärfasens aktivitet. Scanning av blankprovet bekräftade att det var fritt från analyt och att det var fullt dugligt som blankprov.

3.3 Masspektrometrisk karakterisering

3.3.1 Masspektrum av 4,4'-metylendiphenyldiisocyanat -dibutylamin

MDI derivatiserad med DBA gav upphov till några karakteristiska fragment, se figur 5. Två av de starkaste signalerna gavs för masstalet 130 ($[DBAH]^+$) och 156 ($[DBACO]^+$). Båda fragmenten är användbara indikatorer på isocyanater derivatiserade med DBA. Masstalet 156 kan ibland vara en säkrare indikator eftersom det visar närvaron av både en isocyanat och DBA. Signalen från masstalet 509 är protonerad molekyljon ($[MH]^+$) och signalen för 380 svarar mot en protonerad molekyljon som förlorat en DBA ($[MH-DBA]^+$). Olika former av addukter förekommer vanligen, tex. natriumaddukter. Detta spektrum uppvisar en tydlig signal för masstalet 531 ($[MNa]^+$), vilket svarar mot just natriumaddukten av molekyljonen.



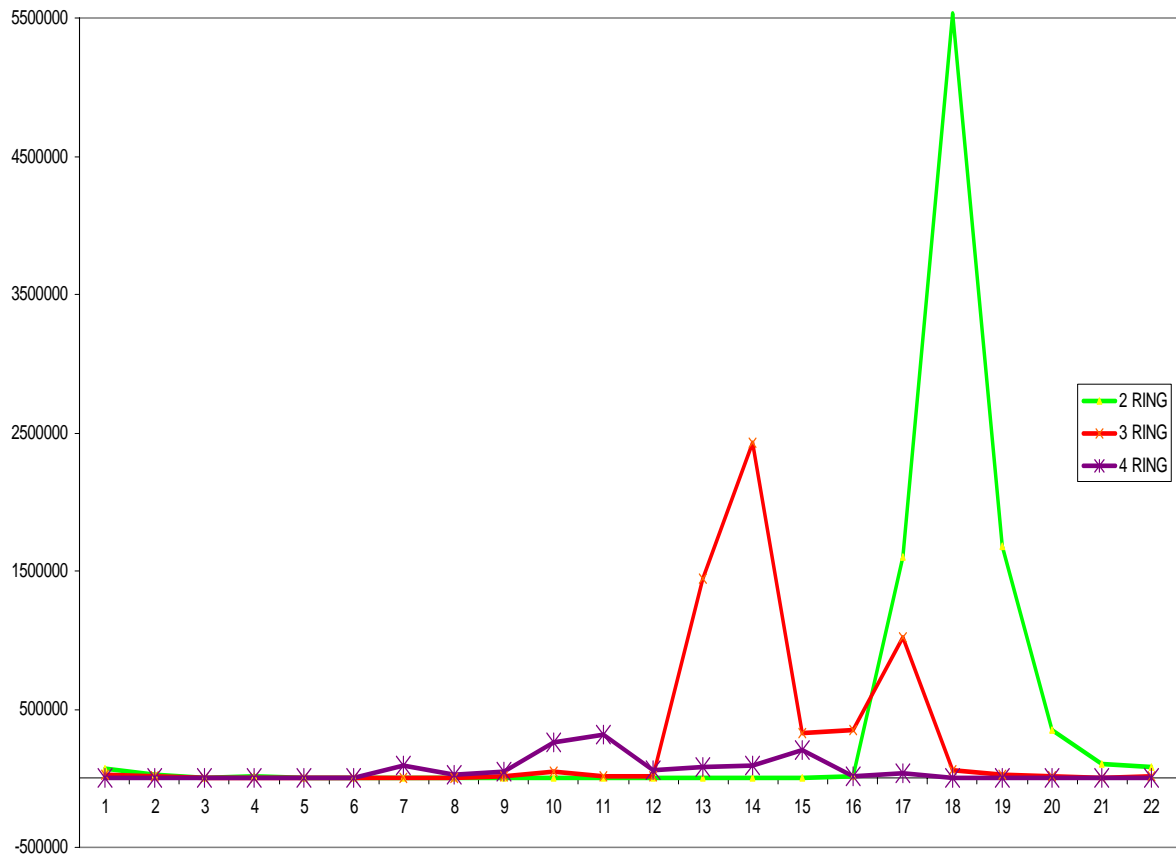
Figur 5: Ett masspektra av 4,4'-MDI-DBA. Spektrumet uppvisar karakteristiska fragment så som $m/z=130$ (DBA), $m/z=156$ (DBA-CO), $m/z=380$ (MDI+1 st DBA), $m/z=509$ (MDI+2 st DBA), $m/z=531$ (MDI+2 st DBA+Na⁺).

3.3.2 Bestämning av identifierbar mängd

Den mängd som applicerades på plattan var 52 μg med avseende på 4-4'-MDI. Efter fraktionering och extraktion gav detta ett prov vars signal var ungefär 100 gånger så stark som bruset. En tolkning av detta skulle kunna vara att 52/33 μg skulle ge en signal som var 3 gånger så stark som bruset. Vilket innebär att minsta identifierbar mängd kan uppskattas till 2 μg applicerat prov på HPTLC-plattan. Masspektrometern var inställd på full scanning. Betydligt lägre koncentrationer hade kunnat identifieras med MRM. Vid återlösning av analyterna efter indunstning användes 5 ml metanol. Denna mängd skulle kunna minskas avsevärt och på så vis sänka identifieringsgränsen. Återlösningen i 1 ml metanol skulle kunna säkerställa identifiering vid lägre koncentrationer.

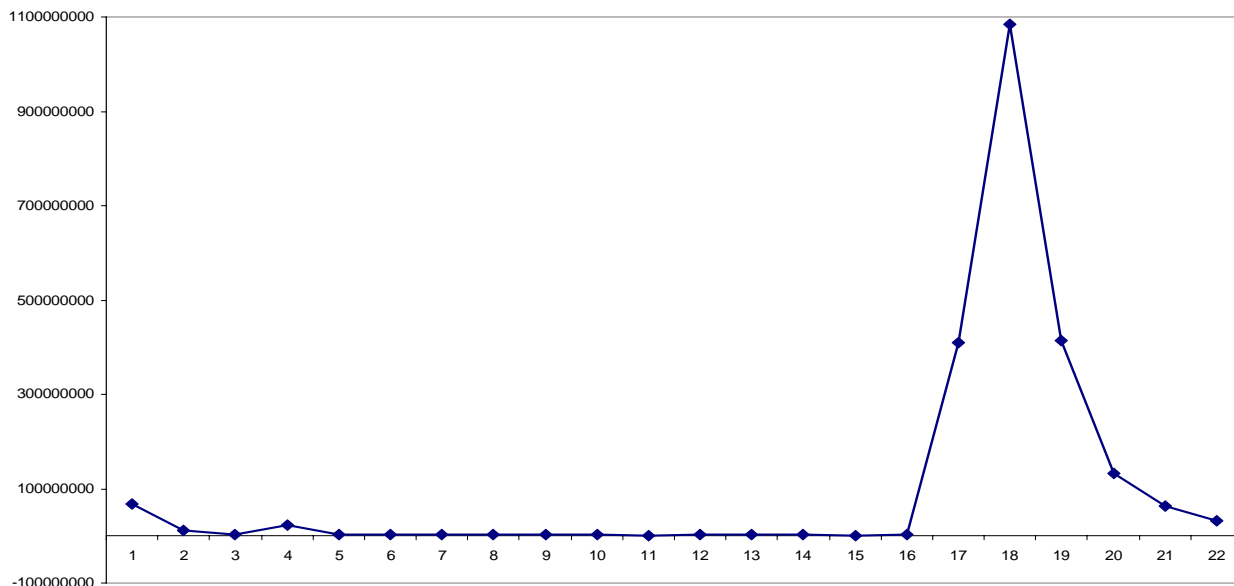
3.3.3 Karakterisering av fraktioner

Kromatogrammet som erhöles gav en relativt klar bild över hur MDI ringserie fördelas över plattan (Se figur 14). Det ser ut som om 3-ring och 4-ring varianterna till och med är på väg att separeras i sina respektive isomerer. Huruvida så faktiskt är fallet är dock oklart.



Figur 14: SIM TLC-MS kromatogram som visar hur TMDI fördelas över en TLC platta. Y-axeln Intensitet, X-axeln: Fraktions nummer där varje fraktion är 2,5 mm bred.

Signalen från masstalet 130 var för utspridd över plattan för att kunna användas som indikator. Det var däremot intressant att se Parents of 156 signalen. De två första fraktionerna ger en märkbar signal som ger er antydning om att det finns isocyanater i dessa fraktioner (se figur 15).



Figur 15: TLC-MS kromatogram av parents of 156 signalen.

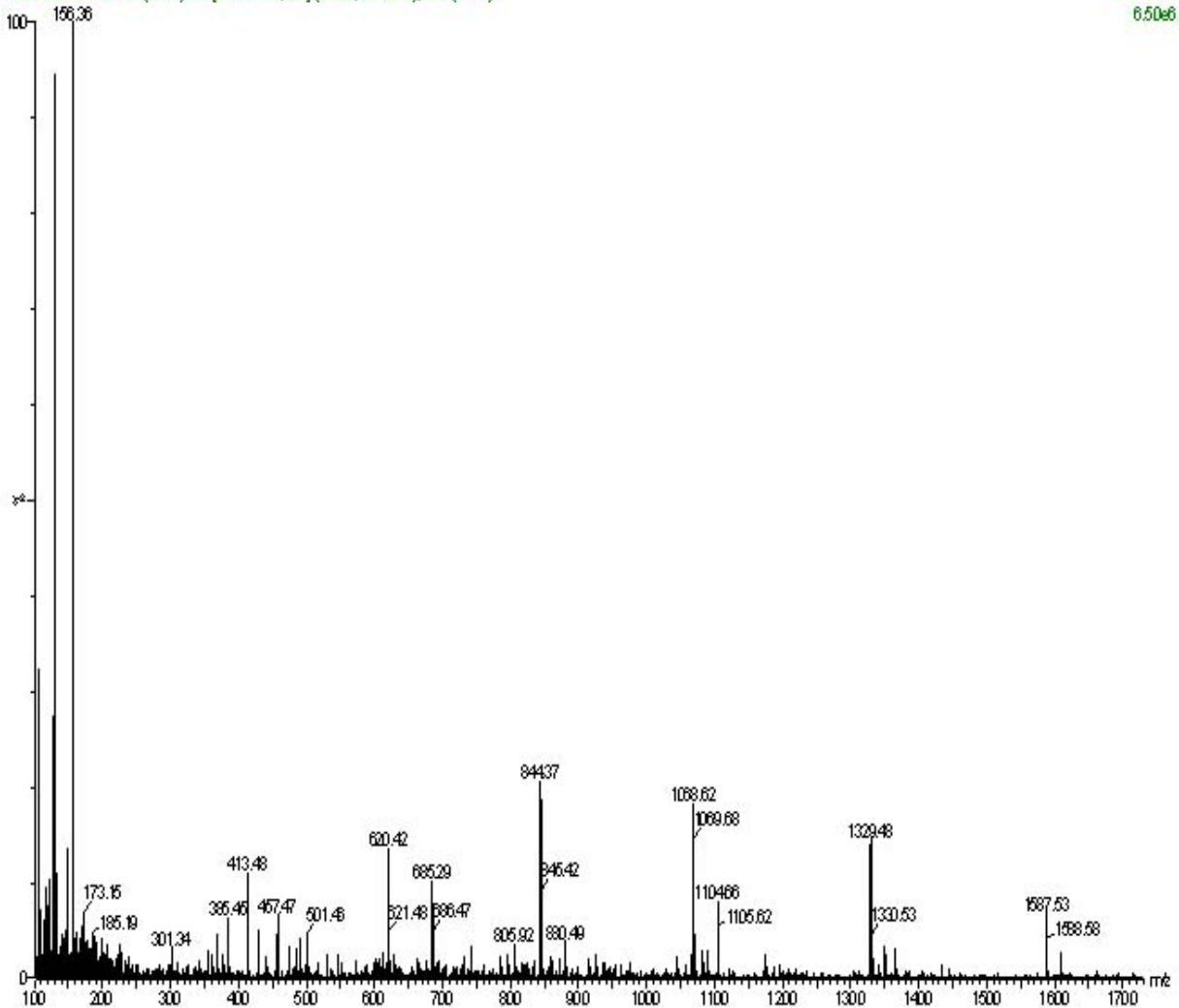
3.3.4 Karakterisering av uppreningsfraktion

Fraktion 1a gav stark signal för masstalet 156 vilket antyder att denna fraktion innehåller isocyanater som derivatiserats, men vidare var det svårt att tolka de spektra som erhöles (se figur 16). Fraktion 2a gav ingen anmärkningsvärd signal från masstalen 509,4 769,6 eller 1029,8 vilket svarar mot masstalen för MDI, 3-ring och 4-ring. Detta visade att uppreningen lyckats och att den starka signalen som fraktion 1a ger för masstalet 156 inte kommer från något av dessa ämnen. MDI och dess ringserie återfanns däremot som väntat i fraktion 3a. Vidare kunde inga flerladdade joner påvisas vid högre masstal vilket var något överraskande.

loop inj av TLC strap

TLDMS060404102_40 (2.084)M2 [E+291373,169] (0.750,100.2833), Om (37.42)

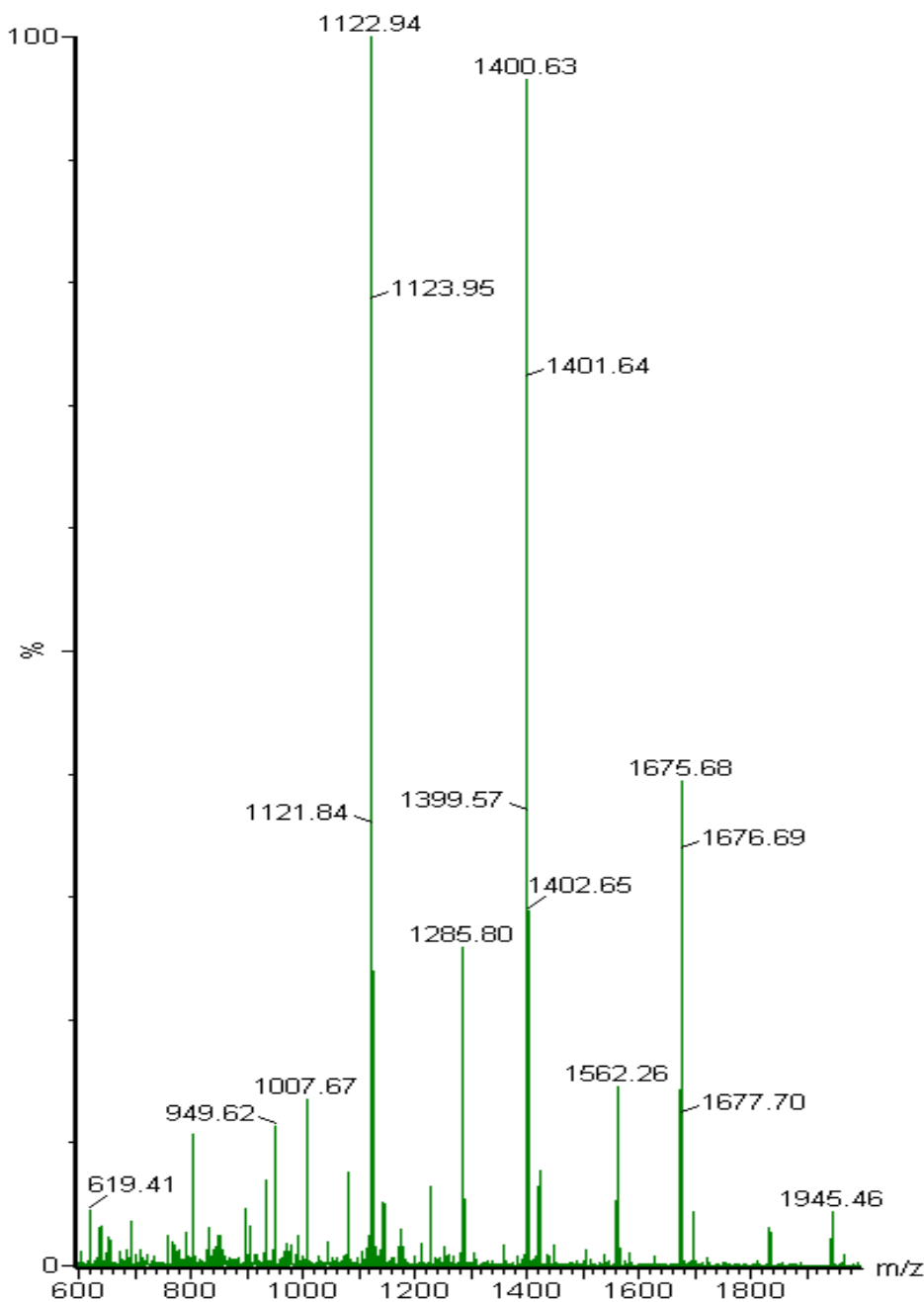
Scan ES+
6.50e6



Figur 16: Uppreningsfraktion 1a: Scan av fraktionen tagen från appliceringspunkten med en kraftig signal från masstalet 130 och 156.

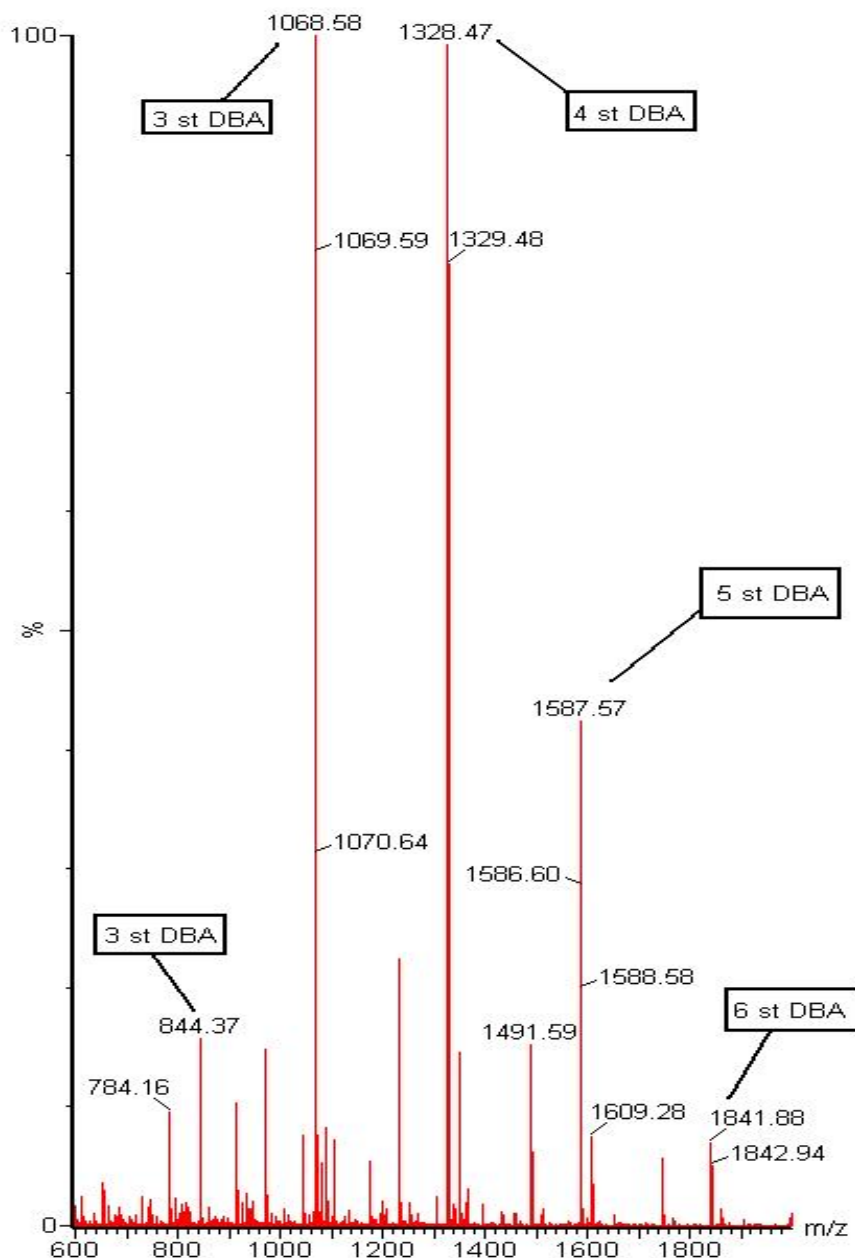
3.3.5 Karakterisering med deuteriummärkt dibutylamin

Det spektra som erhöles från fraktion 1b påminde mycket om det som fraktion 1a tidigare hade gett. Den starka signalen från masstalet 156 hade ersatts av en stark signal från 174 som är motsvarande fragment för isocyanater derivatiserade med D_{18} -DBA (se figur 17). Genom att vidare jämföra intensitet och förhållande i spektra 1a och 1b kunde flera fragment som motsvarade varandra identifieras. Genom att jämföra masstalet för motsvarande toppar i de båda spektrummen kunde antalet isocyanatgrupper i varje fragment bestämmas. Om masstalet för ett fragment från MDI-D18 tex är 72 dalton större än ett motsvarande fragment i spektrumet från MDI-DBA är det högst troligt att detta fragment har derivatiserats med 4 stycken DBA (se figur 18).



Figur 17: Spektra från fraktion 1b, TMDI derivatiserat med deuteriummärkt DBA.

För fragment med massa nära 2000 u var överensstämmelsen inte fullt lika påtaglig för motsvarande beräkning. Det är högst troligt att detta beror på att masspektrometern inte är kalibrerad med fokus på så stora massor. Det gick inte att med säkerhet fastställa vilka masstal som svarade mot molekylljonerna. Det gick fortfarande inte att se några flerladdade joner.



Figur 18: Spektra från fraktion 1a, TMDI derivatiserat med vanligt DBA. Genom att jämföra intensiteten och förhållandena i spektrat med motsvarande för deuteriummärkt DBA kunde ekvivalenta fragment identifieras och antalet isocyanatgrupper i varje fragment bestämmas.

3.3.6 Karakterisering av fraktioner med vätskekromatografi-masspektrometri

Tidigt i kromatogrammet uppstod små toppar för prov 1a och 1b, men det visade sig att dessa förekom även i blankprovet. Efter 27 minuter eluerades en topp som gav signal för masstalet 156. Denna signal var dock svag och det stod klart att det återstod mer att eluera.

I hopp om att sent eluerade komponenter skulle kunna påvisas förlängdes körtiden för kromatografen till 180 minuter, men utan framgång.

4 Slutsatser

Separation med HPTLC och detektion i TLC-scanner är ett smidigt sätt att få en uppfattning om sammansättningen på DBA-derivat av teknisk MDI. Okända toppar från TLC-kromatogrammet kan studeras mer ingående genom att integrera HPTLC med MS.

Metoden är fullt möjlig även för teknisk MDI som derivat av andra aminer. Retentionen för TMDI vid HPTLC påverkas dock starkt av vilken amin som använts vid derivatiseringen. Ju kortare kolkedja på aminen desto högre retention.

Löslighetsproblem kan inte uteslutas som en begränsande faktor för metoden. Metanol, toluen och THF visade sig likvärdiga utifrån de tester som gjordes. Detektionen gjordes dock med scanner vilket inte i detta fall inte ger särskilt selektivt resultat och kanske skulle MS detektion ha gett mer detaljerad information. I de fall då det kan fastställas att löslighetsproblem inte är troliga, för analyten av intresse, bör provlösningsmedel väljas så att låg elueringsstyrka uppnås, för bästa kromatografi.

Extraktion är ett kritiskt moment vid all TLC som har preparativ karaktär och därmed även för denna metod. Extraktion med etylacetat ger goda resultat och lösligheten av kisel i etylacetat tycks inte vara så omfattande att det medför problem vid detektion i masspektrometern.

Användandet av preparativa TLC-plattor var inte nödvändigt vid de försök som utfördes, men kan vara fördelaktigt i fall då omfattande upprening fodras.

Minsta identifierbara mängd för metoden bestämdes 2 µg. Detta gjordes med viss approximation men värdet ger ändå användbara uppgifter om lämpliga appliceringsmängder då HPTLC integreras med MS.

I uppreningsfraktionerna gick det att påvisa okänt isocyanat innehåll via omfattande förekomst av fragment med masstalet 156. Fraktionen var separerad från andra kända isocyanater och det är därför högst osannolikt att fragmentet skulle härröra från vanligt förekommande oligomerer av MDI. Vidare uppgifter var svåra att urskilja direkt från spektrumet på grund av avsaknaden av kända fragment.

Karakterisering med d_{18} -DBA säkerställde identifieringen av fragment som härrörde från derivatiserade joner och bestämning av antalet isocyanatgrupper i flera fragment med omfattande förekomst. För fragment med större masstal blev denna bestämning svårare på grund av masspektrometerns begränsningar. Användandet av en time of flight analysator övervägdes och kanske hade ett sådant spektra möjliggjort bestämning av antalet isocyanatgrupper på tyngre fragment.

Ersättningen av DBA med d_{18} -DBA påverkade inte retentionen märkbart vid HPTLC och fullt jämförbar uppreningsfraktion kunde göras vilket bidrog till att spektrumen var så lätta att jämföra.

Det gick inte att bestämma vilka masstal som tillhörde molekyljonerna. Kanske hade vidare upprensning kunnat ge ett renare spektra och bättre förutsättningar för identifikation av molekyljonernas masstal.

Flerladdade joner kunde inte ses i något av de spektra som erhöles. Orsaken till detta är oklar, men eftersom flödet från LC pumparna blandas med vatten och myrsyra borde förutsättningarna för generös jonisation vara goda.

Då fraktionerna 1a och 1b analyserades med LC-MS kunde inte de fragment, som identifierats som derivat av DBA återfinnas. Körtiden för analysen förlängdes, men endast mycket svaga signaler från masstalet 156 kunde detekteras. Detta skulle kunna vara ett tecken på att merparten av de isocyanater som finns i fraktionerna 1a och 1b är av den typen att de är svåreluerade i ett reversed phase system och att de är bidragande till underskattandet av isocyanatinnehållet i TMDI i samband med kromatografiska metoder.

Skulle man kunna analysera fraktion 1a och 1b med LC-MS så att renare spektra hade kunnat erhållas hade kanske det kunnat bistå i karakteriseringen av innehållet i dessa fraktioner. Kanske skulle bättre resultat kunna uppnås i ett normal phase system. Ett annat alternativ hade varit att ytterligare rena fraktionerna via gelfiltrering.

5 Referenser

1. Marand Å., Dahlin J., Karlsson D., Skarping G., Dalene M., *J. Environ. Monit.*, 6, 2004, 610-614.
2. Klees J.E., Ott M.G., *Occup Med.*, 14, 1999, 759-776.
3. Skarping G., Dalene M., Svensson B.-G., Littorin M., Åkesson B., Welinder H., Skerving S., *Occup. Environ. Med.*, 53, 1996, 180.
4. International Agency for research on cancer (IARC), Vol. 16, *Some chemicals used in plastics and elastomers*, Lyon, 1978
5. International Agency for research on cancer (IARC), Vol. 39, *Aromatic amines and related nitro compounds*, Lyon, 1986
6. Vandenplas O., Malo J.L., Saetta M., Mapp C.E., Fabbri L.M., *Br. J. Ind. Med.*, 50, 1993, 213-228
7. Raulf-Heimsoth M., Baur X., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 34, 1998, 137-43.
8. Karlsson D., Spanne M., Dalene M., Skarping G., *Analyst*, 123, 1998, 117-123.
9. Tremblay P., Lesage J., Ostiguy C., Van Tra H., *Analyst*, 128, 2003, 142-149
10. Karlsson D., Spanne M., Dalene M., Skarping G., *J. Environ Monit.*, 2, 2000, 462-469.
11. Karlsson D., Dahlin J., Marand Å., Skarping G., Dalene M., *Analytica Chimica Acta*, 534, 2005, 267-268.

Tack

Jag vill tacka alla de glada människorna på arbetsmiljökemi för att jag gavs möjlighet att genomföra mitt examensarbete i en välkomnande positiv miljö. Ett extra stort tack till min handledare Daniel Karlsson för god vägledning genom arbetet.

Jag vill även tacka Seemei som tålmodigt stått ut med att jag dagarna i ända haft Enya som bakgrundsmusik (på "repeat"), på vårt gemensamma kontor.

Appendix

Tabell 1. Parametrar som genomgående användes vid scanning med Camag TLC scanner 3

| | |
|-------------------------|------------------------|
| Slit dimensions | 6,00×0,45 mm, Micro |
| Optimize optical system | Light |
| Scanning speed | 20 mm/s |
| Data resolution | 100 µm/step |
| Wavelength | 254 nm |
| Lamp | D2 & W |
| Measurement type | Remission |
| Measurement mode | Absorption |
| Optical filter | Second order |
| Detector mode | Automatic |
| PM high voltage | 0 V |

Tabell 2: Mobilfas gradient som användes genomgående vid LC-MS.

| Tid [min] | A% | B% |
|-----------|----|-----|
| 0 | 50 | 50 |
| 15 | 35 | 65 |
| 20 | 0 | 100 |
| 120 | 0 | 100 |
| 120 | 50 | 50 |

Tabell 3: Standardlösningar som användes för bestämning av utbyte vid extraktion.

| Lösning | massa [µg] |
|---------|------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 0,242 |
| 3 | 0,483 |
| 4 | 0,966 |

Tabell 4: MRM- parametrar som vid bestämning av utbyte vid extraktion.

| Reaktion | Konspänning [V] | Kollisionsenergi [eV] |
|------------------|-----------------|-----------------------|
| 509,40 • 130,20 | 40,0 | 30,0 |
| 527,40 • 139,20 | 40,0 | 30,0 |
| 769,60 • 130,20 | 40,0 | 36,0 |
| 796,60 • 139,20 | 40,0 | 36,0 |
| 1029,80 • 130,20 | 50,0 | 38,0 |
| 1065,80 • 139,20 | 50,0 | 38,0 |
| 1290,00 • 130,00 | 55,0 | 38,0 |
| 1335,00 • 139,20 | 55,0 | 38,0 |
| 1550,10 • 130,20 | 55,0 | 38,0 |
| 1604,10 • 139,20 | 55,0 | 38,0 |

Tabell 5: Masspektrometer parametrar vidbestämning av utbyte.

| | |
|-------------------------|-----------------|
| Capillary voltage | 3,56/ 3,53 kV |
| Cone voltage | 3,059 kV |
| Source temperature | 130 °C |
| Desolvation temperature | 250 °C |
| Desolvation gasflow | 602 liter/timme |

Tabell 6: Masspektrometer parametra vid bestämning av "minsta identifierbara mängd", försök 2.6.1.

| | |
|-------------------------|-----------------|
| Capillary voltage | 4,63/ 4,58 kV |
| Cone voltage | 4,353 kV |
| Source temperature | 130 °C |
| Desolvation temperature | 200 °C |
| Desolvation gasflow | 616 liter/timme |

Tabell 7: Parametra för de 7 SIR kanalerna vid karakterisering av fraktioner, försök 2.6.2.

| Masstal [u] | Konspänning [V] |
|-------------|-----------------|
| 130,20 | 50,0 |
| 156,20 | 50,0 |
| 509,4 | 40,0 |
| 769,6 | 40,0 |
| 1029,8 | 50,0 |
| 1290,00 | 50,0 |
| 1550,10 | 50,0 |

Tabell 8: Parametra för de 6 SIR kanalerna för prov 1a vid karakterisering med deuteriummärkt DBA, försök 2.6.4.

| Masstal [u] | Konspänning [V] |
|-------------|-----------------|
| 971 | 70 |
| 1068,6 | 70 |
| 1232 | 70 |
| 1328,5 | 70 |
| 1491,6 | 70 |
| 1587,6 | 70 |

Tabell 9: Parametra för de 6 SIR kanalerna för prov 1b vid karakterisering av fraktioner med LC-MS, försök 2.6.5.

| Masstal [u] | Konspänning [V] |
|-------------|-----------------|
| 1007,7 | 70 |
| 1122,9 | 70 |
| 1285,80 | 70 |
| 1400,6 | 70 |
| 1562,3 | 70 |
| 1675,7 | 70 |