

<b>Analysenblatt</b>	<b>Cu-HDO</b> <b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazoniumdioxyl)-Kupfer</b>	Stand 07/2013 Seite 1 von 8
----------------------	---	--------------------------------

## Analyse von „N-Cyclohexyldiazoniumdioxid“ (HDO) aus Holz

### Flüssigkeitschromatographisches Verfahren mit HPLC und UPLC

#### Allgemeine Grundlagen

Die quantitative Bestimmung von Bis-(N-Cyclohexyldiazoniumdioxyl)-Kupfer (Cu-HDO) bzw. „N-Cyclohexyldiazoniumdioxid“ (HDO) erfolgt durch Ultraschall-Extraktion von Holzmehl mit phosphorsaurem Methanol /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung-Gemisch und nachfolgender Analyse mittels HPLC-UV oder UPLC-UV.

Hinweis: Das Verfahren ist für einen Gehalt von 50 bis 2000 mg Cu-HDO/kg Holz (HPLC) bzw. 5 bis 1500 mg Cu-HDO/kg Holz (UPLC) anwendbar.

#### Reagenzien und Geräte

##### Reagenzien

1. Methanol zur Analyse,  $\text{CH}_3\text{OH}$  (CAS-Nr. 67-56-1)
2. Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (CAS-Nr. 7778-77-0)
3. Phosphorsäure zur Analyse,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (CAS-Nr. 7664-38-2)
4. Standard: Bis-(N-Cyclohexyldiazonium-dioxy)-Kupfer (Reinheit > 98 %) (CAS-Nr. 312600-89-8; erhältlich von der BASF Wolman GmbH)
5. Reinstwasser HPLC - Grade

##### Geräte

1. Schneid- und Zentrifugalmühle
2. Analysenwaage
3. Ultraschallbad
4. verschließbares Glasgefäß mit dichtem Schraubdeckel
5. Messkolben
6. pH-Meter
7. 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE-Spritzenvorsatzfilter einschließlich Einwegspritzen (HPLC) bzw. 0,20  $\mu\text{m}$  PTFE-Spritzenvorsatzfilter einschließlich Einwegspritzen (für UPLC)
8. HPLC mit UV-Detektor oder U(H)PLC mit UV- bzw. PDA-Detektor

<b>Analysenblatt</b>	<b>Cu-HDO</b> <b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazoniumdioxy)-Kupfer</b>	Stand 07/2013 Seite 2 von 8
----------------------	--	--------------------------------

### **Extraktion von Cu-HDO aus behandeltem Holz**

Zur Probenahme für Holz siehe DIN EN 212: 2003-09

1. Das zu untersuchende luftgetrocknete Holz wird mittels einer geeigneten Labormühle (Schneid- und Zentrifugalmühle) auf eine Partikelgröße von < 500 µm zerkleinert.
2. 0,5 bis 1,00 ± 0,001 g des zerkleinerten Holzes werden in ein dicht verschließbares 100 ml Glasgefäß mit Schraubdeckel eingewogen.
3. Anschließend wird die 50-fache Menge (bezogen auf Holzeinwaage; Verhältnis Holz zu Extraktionsmittel: 1:50; d.h. bei 0,5 g Holz-Einwaage ein Volumen von 25 ml) an Eluenten-Gemisch zugegeben. Das Eluenten-Gemisch besteht aus 45 Teilen Methanol p.A. und 55 Teilen 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und wird nach dem Mischen der Bestandteile durch Zugabe von Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt.
4. Die Suspension wird im geschlossenen Glasgefäß für zwei Stunden bei maximaler Leistung in ein auf 45 °C vorgeheiztes Ultraschallbad gestellt. Während der Extraktion ist eine Temperatur des Ultraschallbades im Bereich von 45°C bis 60°C einzuhalten. Falls die Temperatur über 55 °C ansteigt, ist die Heizung des Ultraschallbades abzustellen oder (falls keine Heizung vorhanden) die Wassertemperatur durch Zugabe von kaltem Wasser einzustellen. Das Holzmehl wird alle 30 min durch Umschwenken des Glasgefäßes suspendiert.
5. Nach zwei Stunden wird das Glasgefäß dem Ultraschallbad entnommen. Man lässt das Gefäß auf Raumtemperatur abkühlen.
6. Danach wird eine Teilmenge des Extraktes mittels eines 0,45 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilters in einen HPLC-Vial abfiltriert (bei UPLC erfolgt die Filtration systembedingt mit 0,20 µm PTFE-Filter).
7. Der Extrakt soll umgehend mit HPLC oder UPLC analysiert werden. Ist eine Analyse am Extraktionstag nicht möglich, können Extrakte im Kühlschrank bis zu vier Tagen aufbewahrt werden.

#### **Hinweise:**

Der Feuchte-Gehalt des Holzmehls wird parallel an gesondertem Material bestimmt (DIN EN 212)

Die Untersuchung von unbehandeltem, naturbelassenem Holz gleicher Art ermöglicht die Bestimmung eines Blindwertes.

Daneben wird die Untersuchung von Holz mit definiertem Cu-HDO – Gehalt zur Ermittlung einer internen Wiederfindungsrate empfohlen.

Analysenblatt	<b>Cu-HDO</b> <b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer</b>	Stand 07/2013 Seite 3 von 8
---------------	--	--------------------------------

## Quantitative Bestimmung von Cu-HDO im Extrakt

### Durchführung / Probenvorbereitung

#### Reinigung der Geräte

Die Reinigung der Glasgeräte erfolgt durch Waschen mit reinigungsmittelhaltigem Wasser. Danach werden die Glasgeräte mit destilliertem bzw. deionisiertem Wasser gespült.

#### Herstellung der Stammlösung

0,2 ± 0,0001 g Bis-(N-Cyclohexyldiazenium-dioxy)-Kupfer mit einer Reinheit > 98 % werden in 50 ml Methanol p. A. gelöst.

#### Haltbarkeit

Die Stammlösung kann im Kühlschrank bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

#### Kalibrierung

Es erfolgt eine externe Mehrpunkt-Kalibrierung (wenigstens 3 Standards) im Bereich von 5 – 70 mg Cu-HDO/l (HPLC) bzw. 0,2 – 40 mg Cu-HDO/l (UPLC), wobei die Kalibrierlösungen aus der Stammlösung durch Verdünnen mit Eluentengemisch hergestellt werden.

Die Kalibrierlösungen sind jeden Tag frisch anzusetzen.

Jeder Standard wird mindestens 3-mal vor und nach jeder Messserie vermessen.



<b>Analysenblatt</b>	<b>Cu-HDO</b> <b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer</b>	Stand 07/2013 Seite 4 von 8
----------------------	--	--------------------------------

### Analyse mittels HPLC

Rahmenbedingungen HPLC (Beispiel):

- Säule: Phenomenex Synergi Max-RP 80A (4 µm)
- Abmessungen Säule: Länge 150 mm, Durchmesser 4,6 mm
- Vorsäule: Phenomenex Cartridge Synergi Max RP, 4 x 3,0 mm
- Wellenlänge: 229 nm
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Fluß: 1,1 ml/min
- Säulenofen-Temperatur: 40 °C
- Eluent: 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und Methanol p.a. im Verhältnis von 55:45 mischen und danach mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH = 2,5 einstellen.
- Elutionsart: isokratisch
- Retentionszeit: ca. 6 min (HDO-Peak)
- Dauer eines Laufes: 12 min

Vor dem Start einer Messserie wird zur Konditionierung der Messsäule die Durchführung eines Analysenlaufes (bei neuen Säulen mindestens zweier Analysenläufe) mit dem höchsten Standard empfohlen.

Die Wiederfindungsrate beträgt i.d.R. über 90 %.

### Analyse mittels UPLC

Rahmenbedingungen UPLC (Beispiel):

- Säule: Acquity UPLC BEH Shield RP18; 1,7 µm
- Abmessungen Säule: Länge 150 mm, Durchmesser 2,1 mm
- Vorsäule: Acquity column in-line filter
- Wellenlänge: 229 nm
- Injektionsvolumen: 5 µl
- Fluß: 0,3 ml/min
- Säulenofen-Temperatur: 40 °C
- Eluent: 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und Methanol p.a. im Verhältnis von 55:45 mischen und danach mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH = 2,5 einstellen.
- Elutionsart: isokratisch
- Retentionszeit: ca. 2,7 min (HDO-Peak)
- Dauer eines Laufes: 4,5 min

Vor dem Start einer Messserie wird zur Konditionierung der Messsäule die Durchführung eines Analysenlaufes (bei neuen Säulen mindestens zweier Analysenläufe) mit dem höchsten Standard empfohlen.

Die Wiederfindungsrate beträgt i.d.R. über 90 %.

Analysenblatt	<b>Cu-HDO</b>	Stand 07/2013 Seite 5 von 8
	<b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazoniumdioxy)-Kupfer</b>	

### Auswertung

Für die Berechnung des Cu-HDO-Gehaltes wird die Cu-HDO-Konzentration als Funktion der Peakfläche dargestellt. Durch lineare Regression erhält man die Steigung B und den Achsenabschnitt A der Kalibriergeraden.

Mit Hilfe der Steigung und des Achsenabschnittes kann die Konzentration an Wirkstoff in einer Lösung mit der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$C_{\text{Lösung}} = B * F_{\text{Probe}} + A \quad [\text{mg Cu-HDO/l}]$$

$C_{\text{Lösung}}$  Konzentration an Cu-HDO in der Lösung [mg Cu-HDO/l]  
 $F_{\text{Probe}}$  Peakfläche der Probe

Die Konzentration an Cu-HDO im Holz  $C_{\text{Holz}}$  (in mg/kg (getrocknetes) Holz) wird nach (2) berechnet:

$$C_{\text{Cu-HDO}} = \frac{C_{\text{Lösung}} * V_{\text{Ex}}}{m_{\text{H}}} \quad [\text{mg/kg}]$$

$C_{\text{Cu-HDO}}$  Massekonzentration an Cu-HDO im Holz [mg/kg]  
 $C_{\text{Lösung}}$  ermittelte Konzentration im Analysenextrakt [mg/l]  
 $V_{\text{Ex}}$  Extraktionsvolumen (nach obiger Vorschrift: 0,025 l) [l]  
 $m_{\text{H}}$  Einwaage an Holzspänen (berechnete Trockenmasse) [kg]

### Diese Version des Analysenblattes\* wurde erstellt durch

Bornkessel C., Wegner R., MPA Eberswalde, Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, Eberswalde  
 Fischer M., Institut für Holztechnologie (IHD), Dresden  
 Fürhapper Ch., Prantl S., Holzforchung Austria, Wien  
 Gunschera J., Fraunhofer-Institut für Holzforchung, Wilhelm-Klauditz-Institut (WKI), Braunschweig  
 Drescher P., Härtner H., RÜTGERS Organics GmbH, Mannheim  
 Hill R., Staatliche Materialprüfungsanstalt Darmstadt, TU Darmstadt  
 Melcher E., Thünen-Institut für Holzforchung, Hamburg  
 Schoknecht U., Bundesanstalt für Materialforchung und -prüfung (BAM), Berlin  
 Wilken U., Bernhard Remmers Institut für Analytik GmbH, Lönigen  
 Wittenzellner J., BASF Wolman GmbH, Sinzheim  
 Wobst M., Materialprüfanstalt für das Bauwesen, Braunschweig

\* Die Firmenbezeichnungen wurden gegenüber der Ausgabe 07/2013 im März 2017 aktualisiert.

Anwendungsbereich	Alternative Methoden	Literatur
Formulierung	Photometrie	AWPA A 33-08, 2008 Wittenzellner et al. 1999 Jünger 2002
Holz	HPLC DTD-GC-MS	AWPA A 34-08, 2008 Jünger et al. 2002

<b>Anhang</b>	<b>Cu-HDO</b> <b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer</b>	Stand 07/2013 Seite 6 von 8
---------------	--	--------------------------------

CAS-Nr.: 312600-89-8 Summenformel: C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Cu M: 349,9 g/mol	
--	--

### Allgemeine Information

<i>Chemische Bezeichnung:</i>	<i>Bis-(N-cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer</i>
<i>IUPAC:</i>	<i>bis(N-cyclohexyl-diazenium-dioxy)-copper</i>
<i>CA:</i>	---
<i>Synonyme:</i>	<i>Kupfer-HDO, Cu-HDO</i>
<i>Wirkung:</i>	<i>Fungizid</i>
<i>übliche Anwendungskonzentrationen:</i>	<i>0,5 – 5 % in wasserlöslichen Konzentraten</i>
<i>Kennzeichnung (GHS):</i>	<i>GHS 05, GHS 07, GHS 09</i> <i>Gefahr H 302, H 318, H 410</i>

### Chemisch-physikalische Daten

<i>Schmelzpunkt:</i>	<i>149 °C (1)</i>
<i>Siedepunkt:</i>	<i>Zersetzung bei 182°C (1)</i>
<i>Dampfdruck:</i>	<i>&lt; 1*10<sup>-6</sup> hPa bei 20 °C und 50°C (1)</i>
<i>Löslichkeit (g/100 g) bei 20°C:</i>	<i>0,0006 in Wasser (pH 7)</i> <i>0,49 in Isopropanol</i> <i>2,05 in Methanol</i> <i>24,1 in Chloroform</i> <i>6,1 g/L in N-Octanol (25°C)</i>
<i>Stabilität:</i>	<i>hydrolyse-stabil bei pH 3 und 7 bei relevanten Umgebungstemperaturen (25°C) und unter alkalischen Bedingungen bis zu 50°C</i>

(1) Daten aus dem Draft Assessment Report zur Aufnahme in den Anhang I der BPD.

Anhang	<p style="text-align: center;"><b>Cu-HDO</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Bis-(N-Cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer</b></p>	<p style="text-align: right;">Stand 07/2013 Seite 7 von 8</p>
--------	---	---

### Normen und Literatur

AWPA A 33-08 (2008): Standard Method for the Analysis of N-Cyclohexyldiazeniumdioxide (HDO) in Concentrates and Treating Solutions by Calorimetry.

AWPA A 34-08 (2008): Standard Method for the Analysis of N-Cyclohexyldiazeniumdioxide (HDO) in Wood treated with HDO containing Solutions by HPLC.

DIN EN 212:2003-09: Holzschutzmittel – Allgemeine Anleitung für die Probenahme und Probenvorbereitung von Holzschutzmitteln und von behandeltem Holz für die Analyse; Deutsche Fassung EN 212:2003

Jüngel, P.; De Koning, S.; Brinkman, U. A. T.; Melcher, E. 2002: Analyses of the wood preservative component N-cyclohexyl-diazeniumdioxide in impregnated pine sapwood by direct thermal desorption - gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A 953, 199-205.

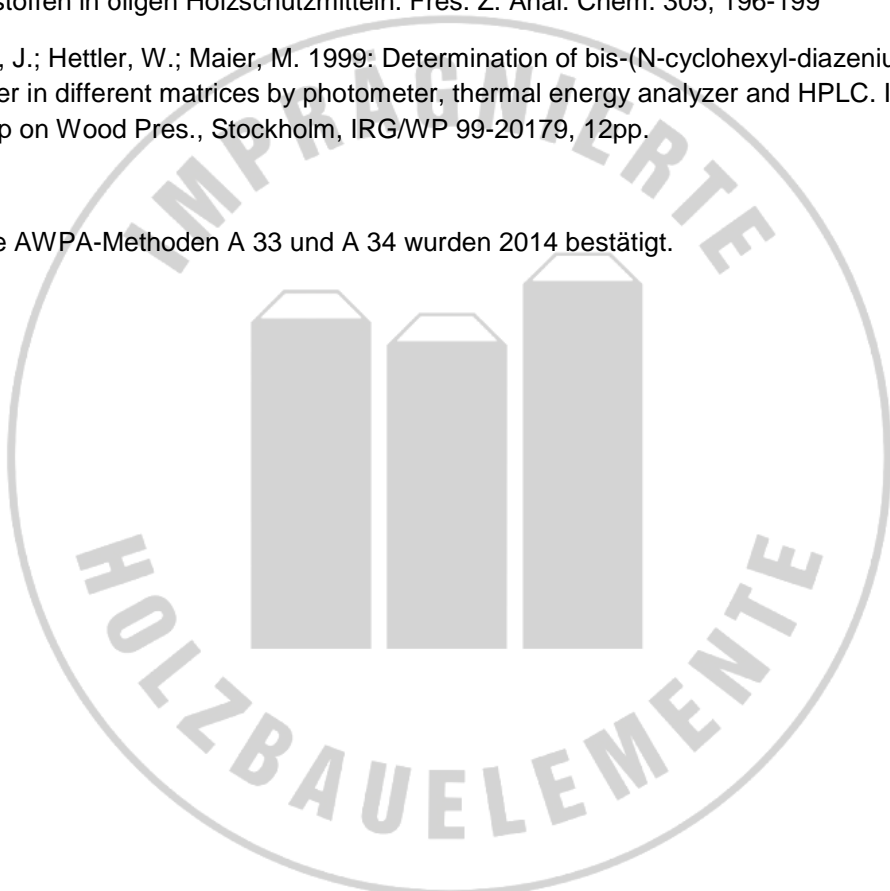
Jüngel, P. 2002: Zur Analytik der organischen Komponente von Bis-(N-cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer in Holz mittels Direkte Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (DTD-GC-MS). Dissertation, Hamburg. 175 S.

<http://www.sub.uni-hamburg.de/disse/801/dissertation.pdf>

Petrowitz, H.-J.; Wagner, M. 1982: Dünnschichtchromatographie von insektiziden und fungiziden Wirkstoffen in öligen Holzschutzmitteln. Fres. Z. Anal. Chem. 305, 196-199

Wittenzellner, J.; Hettler, W.; Maier, M. 1999: Determination of bis-(N-cyclohexyl-diazenium-dioxy)-copper in different matrices by photometer, thermal energy analyzer and HPLC. Int. Res. Group on Wood Pres., Stockholm, IRG/WP 99-20179, 12pp.

Nachtrag: Die AWPA-Methoden A 33 und A 34 wurden 2014 bestätigt.



### Ergebnisse von Vergleichsuntersuchungen

Ergebnisse eines Ringversuchs zur Methode AWPA A34

Zeitraum: Mai bis Juli 2007

Untersuchungsmaterial: imprägniertes Kiefernholz (Southern Yellow Pine)

Analysengeräte: HPLC mit UV-Detektor oder PDA

Tabelle: Übersicht über die durchgeführten Analysen

Labor	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
1	270	408	560	715	848	1157
2	306	444	606	786	963	1289
3	312	463	632	802	968	1294
4	295	453	636	800	953	1290
5	287	452	616	787	961	1267
6	308	451	609	774	949	1280
7	254	411	580	756	933	1261
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
<b>Mittelwert</b>	<b>290</b>	<b>440</b>	<b>606</b>	<b>774</b>	<b>939</b>	<b>1263</b>
<b>StdAbw.</b>	<b>20,0</b>	<b>20,2</b>	<b>25,3</b>	<b>28,2</b>	<b>38,8</b>	<b>44,6</b>
<b>RSD [%]</b>	<b>6,9</b>	<b>4,6</b>	<b>4,2</b>	<b>3,7</b>	<b>4,1</b>	<b>3,5</b>

Die hier angegebenen Analysenergebnisse sind jeweils Mittelwerte aus je 3 Einzelbestimmungen pro Probe.

Die statistische Auswertung des Ringversuches nach ASTM E-691 ist im AWPA Standard A34-08 unter Punkt 9 angegeben (Repeatability, Reproducibility).

#### Teilnehmer\*

Anzahl der Labore: 7

Schoknecht, U., BAM Bundesanstalt für Materialforschung u. -prüfung, Berlin, Deutschland

Wittenzellner, J., BASF Wolman GmbH, Sinzheim, Deutschland

weitere Teilnehmer aus den USA

\* Die Firmenbezeichnungen wurden gegenüber der Ausgabe 07/2013 im März 2017 aktualisiert