

## Bepaling van aromatische amines in water

---

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>4</b>
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
<b>5</b>	<b>REAGENTIA en OPLOSSINGEN</b>	<b>4</b>
5.1	<i>Reagentia</i>	4
5.2	<i>Standaardoplossingen</i>	5
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b>	<b>5</b>
6.1	<i>Extractie</i>	5
6.2	<i>Kalibratieoplossingen</i>	6
6.3	<i>GC-MS/MS analyse</i>	6
6.4	<i>Kalibratie</i>	6
6.4.1	<i>Kalibratiemethoden</i>	6
6.4.2	<i>Terugvinding van de IS</i>	7
6.4.3	<i>Identificatie</i>	7
6.4.4	<i>Kwantificering</i>	8
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b>	<b>8</b>
7.1	<i>Responslineariteit</i>	8
7.2	<i>Chromatografische scheiding</i>	8
<b>8</b>	<b>RAPPORTERING</b>	<b>8</b>
	<b>BIJLAGE 1: Typische GC-MS werkvoorwaarden voor de bepaling van aromatische amines</b>	<b>9</b>
	<b>BIJLAGE 2: Typische Retentietijden (DB-XLB) en MS/MS transities</b>	<b>10</b>

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure is nieuw en beschrijft een analysemethode voor de bepaling van aromatische amines in oppervlaktewater, grondwater, drinkwater en afvalwater met GC-MS/MS. De volgende componenten kunnen met de methode kwantitatief bepaald worden:

- aniline
- 2-chloroaniline
- 3-chloroaniline
- 4-chloroaniline
- 2,3-dichloroaniline
- 2,4-dichloroaniline
- 2,5-dichloroaniline
- 2,6-dichloroaniline
- 3,5-dichloroaniline
- 3,4-dichloroaniline
- 2-chloro-4-methylaniline
- 3-chloro-2-methylaniline
- 4-chloro-2-methylaniline
- 2-chloro-5-methylaniline
- 2-chloro-6-methylaniline
- 4-chloro-3-methylaniline
- 3,3'-dichlorobenzidine (=4,4'-diamino-3,3'-dichlorobiphenyl)
- 2,2'-dichlorobenzidine (=4,4'-diamino-2,2'-dichlorobiphenyl)
- benzidine
- 4,4'-diaminodifenylmethaan (=4,4'-methylenedianiline)
- 2,4-diaminotoluene

Wegens het ontbreken van geschikte interne standaarden kunnen voor 4-chloro-2-nitroaniline, 2,6-dichloro-4-nitroaniline en 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) minder betrouwbare gehalten bekomen worden. De gemeten gehalten kunnen in dat geval enkel gerapporteerd worden als indicatief.

## 2 PRINCIPE

De waterstalen worden vloeistof-vloeistof met dichloormethaan (DCM) geëxtraheerd. Vóór de extractie worden de interne standaarden toegevoegd. Het extract wordt gederiviseerd met HFBA (heptafluorobutyric anhydride). De kalibratiestandaarden doorlopen de volledige opwerking. De meting gebeurt met GC-/MS/MS.

De identificatie van een te bepalen component steunt op de vergelijking van de retentietijd van het specifiek dochterion van staal en kalibratieoplossing. De kwantificering verloopt volgens de interne standaard methode, waarbij gekende hoeveelheden van deuterium- of <sup>13</sup>C-gemerkte componenten als interne standaarden vóór de extractie aan het staal worden toegevoegd.

De kwantificering gebeurt volgens de interne standaard methode. Dit laat toe automatisch en accuraat te corrigeren voor het rendement van de extractie en van de derivatisering.

### 3 OPMERKINGEN

- Voor monsterconservering en -bewaring wordt verwezen naar WAC/A/010.
- Grondwaterstalen bemonsterd in het kader van bodemonderzoek (bv. Vlarebo, of bv. peilputten voor controle stortplaatsen) worden bij aankomst in het labo opgeschud en men laat de stalen gedurende minstens 4 uur rusten zodat de deeltjes kunnen uitzakken. Aansluitend worden de stalen voorzichtig gedecanteerd. Niet meer dan de helft van de bovenstaande waterlaag wordt gedecanteerd om zo weinig mogelijk deeltjes in bewerking te nemen. Waterstalen die geanalyseerd worden in het kader van menselijke consumptie worden niet gedecanteerd.

### 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

#### 4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- 4.1.2 Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- 4.1.3 Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 4.1.4 GC-MS/MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een triple quad massaspectrometer en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogramma. De GC is eventueel uitgerust met een PTV of on-column groot-volume injector
- 4.1.5 Oven instelbaar op ongeveer 70°C

#### 4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Voor de vloeistof-vloeistofextractie: scheidrecter (500-1000 ml)
- 4.2.2 Geschikte injectiespuiten voor het doperen met interne standaard
- 4.2.6 Fused silica GC-kolom met apolaire stationaire fase (bv. DB5-MS, DB-XLB) of gelijkwaardig, bv. 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
- 4.2.9 Glazen monsterflesjes van 20 ml met cap
- 4.2.10 Pasteurpipetten

### 5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

#### 5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Dichloormethaan (DCM), methanol (MeOH), isopropanol (IPA): residuanalyse
- 5.1.2 Natriumsulfaat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): granulair en watervrij; een geopende verpakking wordt uitgegoten in een schaal en bewaard bij 130°C in een droogoven
- 5.1.3 Derivatiseringsreagens: heptafluorobutyric anhydride (HFBA) (99%)
- 5.1.4 Fosfaatbuffer: maak een oplossing van 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in water

5.1.5 NaOH 1M

## 5.2 STANDAARDOPLOSSINGEN

5.2.1 Individuele natieve componenten: p.a.

5.2.2 Interne standaarden: d4-4-chlooraniline, d3-2,5-dichloroaniline, 13C-3,4-dichloroaniline, d3-2,4-diaminotoluene, d8-benzidine, d8-4,4-methylenedianiline en d6-3,3-diClbenzidine

5.2.3 Additieoplossing voor de kalibratie: maak een mengstandaard van alle natieve componenten in een wateroplosbaar solvent (bv. methanol of isopropanol) in een concentratie van bv. 0.5 mg/l

5.2.4 Additieoplossing IS: maak een mengoplossing van alle interne standaarden in een wateroplosbaar solvent (bv. methanol of isopropanol) met een concentratie van bv. 1 mg/l per component

### Opmerking:

de hierboven beschreven werkwijze vertrekt van zuivere producten waarbij alle standaardoplossingen zelf aangemaakt worden. Indien in de handel reeds bereide standaardoplossingen beschikbaar zijn mogen deze ook gebruikt worden.

## 6 PROCEDURE

### 6.1 EXTRACTIE

- Weeg de monsterfles tot op 0.1 g nauwkeurig.
- Breng de volledige inhoud van de monsterfles over in een geschikte scheidrecther. In geval van grondwater (decantatie, cfr supra) wordt maximum de helft van de bovenstaande fase overgebracht in de scheidrecther.
- Dopeer het waterstaal met een gekende hoeveelheid (bv. 100 µl) van de additieoplossing IS en homogeniseer
- Breng de pH van het staal op >9 met NaOH 1N
- Spoel de monsterfles na met 25 ml DCM en breng de spoelvoeistof over naar de scheidrecther
- Schud krachtig gedurende 5 min.
- Laat de fasen ontmengen. Vang de onderstaande fase op in een erlenmeyer waarbij gedroogd wordt over een filttertje met watervrij Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Voeg nog eens 25 ml DCM toe aan het waterstaal en schud krachtig gedurende 5 min.
- Voeg de onderstaande fase bij de vorige waarbij gedroogd wordt over een filttertje met Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Damp de gecombineerde DCM-fasen in tot een volume van ongeveer 2.5 ml en breng over in een vial van 20 ml
- Voeg 50 µl derivatiseringsreagens HFBA toe, sluit de vial af met een cap en derivatiseer de amines bij 70°C gedurende 10 min.
- Laat de vial afkoelen. Open de vial en voeg 2 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer toe. Schud kort en laat de fasen ontmengen. Voeg eventueel een hoeveelheid water toe om de ontmenging te bevorderen.
- Zonder de DCM-fase af, droog over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en breng het extract over in een meetvial.

## 6.2 KALIBRATIEOPLOSSINGEN

- Breng 500 ml blanco water in een scheidtrechter en voeg een gekende hoeveelheid toe van de additieoplossing met natieve componenten
- Behandel als een waterstaal volgens de werkwijze in 6.1.

## 6.3 GC-MS/MS ANALYSE

- Van de staalpreparaten en van de kalibratiepreparaten wordt standaard 1 µl splitless of on-column in de gaschromatograaf geïnjecteerd. Alternatief kan groot-volume injectie (bijvoorbeeld met een PTV injector of een on-column injector met solvent vapour exit) toegepast worden.
- De chromatografische scheiding van de componenten wordt normaal uitgevoerd op een apolaire capillaire kolom met chemisch gebonden fase. De detectie van de componenten gebeurt met een triple quad massaspectrometer in de SRM-mode. Andere GC-MS/MS systemen zoals Ion Trap kunnen eveneens gebruikt worden. De typische GC-MS/MS werkvoorwaarden voor de analyse zijn weergegeven in bijlage 1. In bijlage 2 zijn de transities en de toewijzing van de interne standaarden weergegeven.

## 6.4 KALIBRATIE

### 6.4.1 KALIBRATIEMETHODEN

De kwantitatieve bepaling van de aromatische amines gebeurt volgens de zgn. interne standaardmethode. Hierbij wordt elke component gekwantificeerd t.o.v. een bepaalde isotoop gemerkte IS die bij het begin van de extractie aan het monster werd toegevoegd.

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van de relatieve responsfactor (RRF), bepaald met minstens één kalibratieoplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. De RRFen voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten en concentraties van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden :

$$RRF_i = \frac{A_i \times C_{IS}}{A_{IS} \times C_i}$$

met		
RRF <sub>i</sub>	=	relatieve responsfactor van component i
A <sub>i</sub>	=	piekoppervlakte van component i bij injectie van de kalibratieoplossing
C <sub>i</sub>	=	concentratie (in ng/µl) van component i in de kalibratieoplossing
C <sub>IS</sub>	=	concentratie (in ng/µl) van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratieoplossing
A <sub>IS</sub>	=	piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van de kalibratieoplossing

De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 kalibratieoplossingen waartussen het staal geïnjecteerd werd.

- aan de hand van 'bracketing'. De kalibratiereeks wordt geïnjecteerd minstens bij het begin en bij het einde van de meetreeks. De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 injecties van de 2 punten waartussen het staal begrepen is.
- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve component en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve amines en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend.

#### 6.4.2 TERUGVINDING VAN DE IS

De terugvinding van de interne standaarden wordt berekend t.o.v. de gemiddelde respons in de kalibratieoplossingen van de meetreeks aan de hand van onderstaande formule:

$$REC_{is} = \frac{A_{is,S}}{A_{is,K}} * 100\%$$

met

$REC_{is}$	=	% terugvinding van de interne standaard
$A_{is,S}$	=	piekoppervlakte van de interne standaard in het staal
$A_{is,K}$	=	gemiddelde piekoppervlakte van de interne standaard in de kalibratieoplossingen

Er worden geen eisen opgelegd aan de terugvinding van de interne standaarden aangezien de standaarden de ganse procedure doorlopen.

#### 6.4.3 IDENTIFICATIE

De natieve amines en de interne standaarden worden geïdentificeerd aan de hand van de criteria voor retentietijden en ionenverhoudingen zoals vastgelegd in procedure WAC/VI/A/003.

In bijlage 2 zijn de karakteristieke ionentransities van de natieve en gemerkte amines weergegeven, en staat voor elke natieve component de overeenkomstige interne standaard vermeld.

Van de geïdentificeerde pieken wordt de oppervlakte of alternatief de piekhoogte bepaald.

#### 6.4.4 KWANTIFICERING

Voor de monsterextracten worden de chromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Van de geïdentificeerde componenten worden de piekoppervlakten berekend (bij voorkeur behorend bij de meest intense transitie). Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de relatieve responsfactoren of kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

## 7 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie (GC), procedureblanco, terugvinding van de interne standaard, controle op gevoeligheid en controlestaal wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

### 7.1 RESPONSLINEARITEIT

De werkwijze voor de bepaling van lineariteit is beschreven in WAC/VI/A/001.

Stelt men bij de monsteranalyse een overschrijding van de bovenste lineaire grens vast, d.i. de hoogst geregistreeerde oppervlakte in het lineaire gebied, dan moet de analyse hernomen worden startend van een verdunde hoeveelheid monsterextract, voor zover het signaal van de interne standaard nog voldoende intens is, of startend van een geringere hoeveelheid monster.

### 7.2 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit wordt opgevolgd aan de hand van de scheiding van een kritische paar.

Alternatief kan de kolomkwaliteit geverifieerd worden aan de hand van het aantal theoretische platen, berekend op basis van de piekarakteristieken voor een gekozen verbinding in het chromatogram van de kalibratiestandaard. Het aantal platen  $N_{th}$  wordt gegeven door :

$$N_{th} = 5.54 * \left( \frac{t_{R_i}}{w_{1/2}} \right)^2$$

Hierbij is  $t_{R_i}$  de waargenomen retentietijd voor de verbinding  $i$  en  $w_{1/2}$  de piekbreedte op halve hoogte, uitgedrukt in dezelfde tijdseenheid.

Om een continue controle te hebben over de kolomkwaliteit is het zinvol de scheidingskarakteristieken uit te zetten in een controlekaart.

## 8 RAPPORTERING

Vermeld in het analyseverslag het gehalte van elk aromatisch amine in  $\mu\text{g/l}$ .



**BIJLAGE 1: TYPISCHE GC-MS WERKVOORWAARDEN VOOR DE BEPALING VAN AROMATISCHE AMINES**

Kolomspecificaties : DB-XLB of equivalent, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

GC-instellingen

Draaggas : Helium  
Constant flow : 1 ml/min  
Injectiemodus : Splitless (purge on na 1 min)  
Split vent : 30 ml / min  
Septum purge : 1 ml / min  
Injectievolume : 1 µl  
Injectietemperatuur : 270°C

Temperatuursprogrammatie GC-oven

65°C isotherm gedurende 1 min  
65°C → 320°C @ 7.5°C / min  
320°C isotherm gedurende 2 min  
totale duur : 35 min

MS/MS instellingen

Mode : tSRM  
Cycle time : 0.15 s  
Q1 peak width (FWHM): 1.5  
Q2 peak width (FWHM): 1.5  
Collision gas pressure : 1.3 mTorr  
Emission current : 50 µA  
Interface temp : 310 °C  
Source temp : 250 °C  
Delay time : 2 min  
Transities : zie bijlage 2

## BIJLAGE 2: TYPISCHE RETENTIETIJDEN (DB-XLB) EN MS/MS TRANSITIES

Rettijd min.	Component	Moederion m/z	Dochterion m/z	Energie eV	Interne standaard
8.16	aniline	289	92	2	IS1
		289	120	2	
9.11	2-chloroaniline	288	169	2	IS1
		323	288	5	
10.85	2-chloro-5-methylaniline	302	183	2	IS1
		337	302	5	
11.25	2-chloro-4-methylaniline	302	183	2	IS1
		337	302	5	
11.58	3-chloroaniline	154	111	2	IS1
		323	154	2	
11.79	2-chloro-6-methylaniline	302	183	2	IS1
		337	302	5	
11.83	4-chloroaniline	154	99	2	IS1
		323	154	2	
12.01	2,4-dichloroaniline	322	203	2	IS2
		357	322	5	
12.05	2,5-dichloroaniline	322	203	2	IS2
		357	322	5	
12.21	2,3-dichloroaniline	322	203	2	IS2
		357	322	5	
12.59	3-chloro-2-methylaniline	337	168	2	IS1
		337	302	5	
12.89	4-chloro-2-methylaniline	337	168	2	IS1
		337	302	5	
13.34	4-chloro-3-methylaniline	337	140	2	IS1
		337	168	2	
13.45	2,6-dichloroaniline	322	203	2	IS2
		322	233	2	
14.11	3,5-dichloroaniline	357	160	2	IS3
		357	188	2	
14.86	3,4-dichloroaniline	357	160	2	IS3
		357	188	2	
14.97	4-chloro-2-nitroaniline*	322	203	2	EXTERN
		322	302	2	
16.42	2,4-diaminotoluene	345	317	5	IS4
		514	345	2	
19.19	2,6-dichloro-4-nitroaniline*	206	176	2	EXTERN
		206	206	0	
25.94	benzidine	576	379	2	IS5
		576	576	0	
26.42	4,4'-methylenedianiline	590	590	0	IS6
		590	132	5	
26.99	3,3'-dichlorobenzidine	644	609	5	IS7
		644	644	0	

27.31	2,2'-dichlorobenzidine	644 644	644 447	0 2	IS7
27.56	4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)*	623 658	300 623	2 2	EXTERN
	INTERNE STANDAARDEN				
11.78	IS1 D4-4-chloroaniline	327 327	103 130	2 2	
12.01	IS2 D3-2,5-dichloroaniline	325 325	151 206	2 2	
14.84	IS3 13C-3,4-dichloroaniline	363 363	138 166	2 2	
16.36	IS4 D3-2,4-diaminotoluene	348 517	320 348	10 2	
25.87	IS5 D8-benzidine	584 584	387 584	2 0	
26.38	IS6 D8-4,4'-methylenedianiline	594 594	594 397	0 2	
26.93	IS7 D6-3,3'-dichlorobenzidine	650 650	453 615	15 15	

\* indicatieve component, kwantificering ahv externe standaard