
Oppuntstelling en validatie van een bepalingsmethode voor formaldehyde in water

Vanermen Guido, Poelmans Ellen, Smets Leen

Studie uitgevoerd in opdracht van LNE
2017/SCT/R/1081

Februari 2017



VITO NV

Boeretang 200 - 2400 MOL - BELGIE
Tel. + 32 14 33 55 11 - Fax + 32 14 33 55 99
vito@vito.be - www.vito.be

BTW BE-0244.195.916 RPR (Turnhout)
Bank 375-1117354-90 ING
BE34 3751 1173 5490 - BBRUBEBB

VERSPREIDINGSLIJST

LNE
VITO

SAMENVATTING

In VLAREM II Bijlage 5.3.2 is voor verzorgingsinstellingen een sectorale lozingsvoorwaarde van 2 mg/L voor formaldehyde opgenomen. Voor de bepaling hiervan ontbreekt echter een geschikte referentiemethode. Met het oog op het bekomen van juiste en vergelijkbare resultaten werd in deze studie een uniforme en gevalideerde methode voor de bepaling van formaldehyde in afvalwater ontwikkeld. Op basis van de resultaten van deze validatiestudie kon besloten worden dat de bepaling van formaldehyde op een betrouwbare wijze kan gebeuren voor de toetsing aan de VLAREM lozingsnorm. De methode vereist een derivatisering en SPE opzuivering/opconcentrering, maar wordt gevolgd door een eenvoudige detectie met LC-UV; deze techniek laat een gemakkelijke kalibratie en kwantificatie toe. Voor complexe afvalwaters kan een bevestigingsanalyse met LC-MS wenselijk zijn. De methode werd opgenomen in een WAC-procedure.

INHOUD

Verspreidingslijst	I
Samenvatting	II
Inhoud	III
Lijst van tabellen	V
Lijst van figuren	VI
HOOFDSTUK 1. Doelstelling	1
HOOFDSTUK 2. Inleiding	3
2.1. <i>Formaldehyde</i>	3
2.2. <i>Bepalingsmethoden voor formaldehyde</i>	4
2.2.1. Bepaling van formaldehyde in water	4
2.2.2. Bepaling van formaldehyde in andere matrices	10
2.2.3. Selectie van de meest aangewezen bepalingsmethode	11
HOOFDSTUK 3. Werkwijze	12
3.1. <i>Analysemethode</i>	12
3.1.1. Reagentia	12
3.1.2. Materiaal	12
3.1.3. Monsteropwerking	12
3.1.4. Meting	13
3.1.5. Kalibratie-oplossingen	14
3.2. <i>Validatieplan</i>	14
HOOFDSTUK 4. Resultaten	15
4.1. <i>Chromatogrammen</i>	15
4.1. <i>Kalibratiediagram</i>	15
4.2. <i>Bepaling van de terugvinding van de derivatiserings- en SPE-opzuiveringsstap</i>	15
4.3. <i>Reductie van de procedureblanco</i>	17
4.4. <i>Herhaalbaarheid</i>	18
4.5. <i>reproduceerbaarheid en meetonzekerheid</i>	20
4.6. <i>De resultaten van de meetreeks van dag 2 zijn samengevat in Bepalingsgrens</i>	20
4.7. <i>Bepalingsgrens</i>	20
HOOFDSTUK 5. Compendiumprocedure	24
HOOFDSTUK 6. Besluit	28
Literatuurlijst	29

Bijlage A – UPLC-UV chromatogrammen (360 nm)	30
Bijlage B: WAC/IV/A/007 – Bepaling van formaldehyde in water - Ontwerp	33

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1: Overzicht van met EPA methode 556 gedetecteerde aldehyden (zie ook het chromatogram in Figuur 1)	8
Tabel 2: Formaldehyde terugvindingen voor addities aan ultrapuur water.	16
Tabel 3: Formaldehyde terugvindingen voor addities aan ultrapuur water (bis).	17
Tabel 4: Procedureblanco's i.f.v. de opwerkingswijze	18
Tabel 5: Formaldehyde meetwaarden voor de validatiestalen, zonder en met additie van formaldehyde (laag = 0.3 mg/L, hoog= 3 mg/L), en terugvindingen (dag 1)	18
Tabel 6: Formaldehyderesultaten voor de validatiestalen, na blancoaftrek, en variatiecoëfficiënt (herhaalbaarheid) berekend o.b.v. de duplobepalingen	19
Tabel 7: Formaldehyde meetwaarden voor de validatiestalen, zonder en met additie van formaldehyde (laag = 0.3 mg/L, hoog= 3 mg/L), en terugvindingen (dag 2)	21
Tabel 8: Overzicht van de terugvindingen voor formaldehyde voor dag 1 en dag 2	22
Tabel 9: Formaldehyderesultaten voor de validatiestalen, na blancoaftrek, en variatiecoëfficiënt (reproduceerbaarheid) berekend o.b.v. duplobepalingen op 2 verschillende dagen	23

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1: Chromatogram van met EPA 556 gedetecteerde aldehyden (zie Tabel 1 voor nummering)	9
Figuur 2: Kalibratiediagram voor formaldehyde-DNPH (concentraties in mg/L)	16
Figuur 3: Formaldehyde-DNPH UPLC-PDA en UPLC-MS chromatogrammen en spectra voor een kalibratiestandaard van 10 mg formaldehyde-DNPH/L	25
Figuur 4: UPLC-PDA en UPLC-MS chromatogram voor een afvalwaterstaal met een concentratie van 0.6 mg formaldehyde/L	27

HOOFDSTUK 1. DOELSTELLING

In VLAREM II Bijlage 5.3.2 is voor verzorgingsinstellingen een sectorale lozingsvoorwaarde van 2 mg/L voor formaldehyde opgenomen. Daarnaast staan in specifieke lozingsvergunningen van een aantal bedrijven (ziekenhuizen, spaanplaatproducenten, ...) afzonderlijke limietwaarden voor de lozing van formaldehyde. Voor de bepaling hiervan ontbreekt echter een geschikte referentiemethode. De controle op formaldehyde gebeurt ofwel niet ofwel aan de hand van een in het gecontacteerde laboratorium geïmplementeerde methode. Verschillende methoden zijn immers gangbaar (colorimetrisch, GC, LC). Met het oog op het bekomen van juiste en vergelijkbare resultaten werd in deze studie een uniforme en gevalideerde methode voor de bepaling van formaldehyde in afvalwater ontwikkeld. Deze methode wordt opgenomen in het WAC.

Het werkprogramma omvatte de volgende taken:

- Literatuurinventarisatie van gangbare methoden en selectie van de meest geschikte werkwijze voor afvalwater
- Implementatie en optimalisatie van de gekozen werkwijze
- Validatie van de methode a.d.h.v. geselecteerde afvalwaters (bepaling van reproduceerbaarheid, terugvinding en bepalingsgrens)
- Rapport en WAC-methode

HOOFDSTUK 2. INLEIDING

2.1. FORMALDEHYDE

Formaldehyde (CH_2O , methanal, CAS nr 50-00-0) is een gas met een zeer sterke, onaangename geur. Het is de eenvoudigste organische verbinding uit de stofklasse der aldehyden. Het wordt bereid door dehydrogenatie van methanol.

Formaldehyde is goed oplosbaar in water ($>1000 \text{ g/L}$), ethanol, di-ethylether en benzeen. Formaldehyde wordt meestal als een oplossing van 37% formaldehyde in water aangeboden (formaline of formol). Formaldehyde wordt ook in gepolymeriseerde vorm geleverd onder de naam paraformaldehyde, een wit fijn poeder. De polymerisatiegraad bedraagt 8-100. Deze vorm heeft het voordeel dat het een minder vluchtige verbinding en langer houdbaar is. Bij hogere polymerisatiegraden ontstaan de termoplastische polyacetalen. Verder komt formaldehyde voor als trimeer, trioxaan. Dit is een vaste stof met een smeltpunt van 64°C .

De toepassingen van formaldehyde zijn zeer divers. Het wordt onder andere gebruikt:

- Bij de aanmaak van spaanderplaten, MDF en polyurethaanschuimisolatie.
- Bij de behandeling van textiel (kleding, gordijnen en tapijten).
- Voor de aanmaak van polymeren: naast de bovenvermelde polyacetalen worden in reactie met ureum, fenol en melamine resp. ureumformaldehyde, fenolformaldehyde (bakeliet) en melamineformaldehyde harsen gevormd.
- Als conserveermiddel in cosmetica, soms in de vorm van formaline, maar vaker onder de vorm van zogenaamde formaldehydedonoren: dit zijn stoffen die langzaam formaldehyde afgeven. Voorbeelden van formaldehydedonoren zijn:
 - o bronopol
 - o imidazolidinylureum
 - o diazolidinylureum
 - o DMDM-hydantoïne
 - o benzylhemiformal
 - o quaternum 15

In de cosmetische industrie wordt formaldehyde veel gebruikt als ontsmettingsmiddel van installaties en verpakkingen, waardoor veel soorten cosmetica kleine hoeveelheden formaldehyde kunnen bevatten.

- Als reagens voor de aanmaak van vele chemicaliën. De *Ashford's Dictionary or Industrial Chemicals* vermeldt een 300-tal stoffen waarbij formaldehyde als bouwsteen werd gebruikt.
- In de leerindustrie, als desinfectans/conserveermiddel.
- In de papierindustrie voor het meer waterresistent maken van papier
- In de fotografische industrie voor het verstijven van gelatine.
- In ziekenhuizen en klinische laboratoria als desinfectans
- In de landbouw als fumigant
- ...

Formaldehyde verschijnt in het watercompartiment via industriële lozingen, accidentele lozingen en neerslagdepositie. Een studie toonde aan dat formaldehydeconcentraties 3 maal hoger zijn in regenwater dan in oppervlaktewater (Kieber, 1999). In drinkwater ontstaat formaldehyde door oxidatie van natuurlijke organische stoffen, bv. door ozonisatie van humuszuren.

Formaldehyde is giftig. Het is ook een bewezen carcinogeen voor de mens.

2.2. BEPALINGSMETHODEN VOOR FORMALDEHYDE

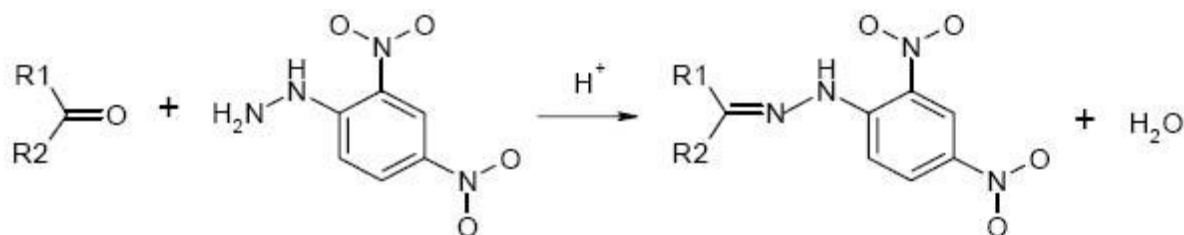
2.2.1. BEPALING VAN FORMALDEHYDE IN WATER

Er zijn weinig methoden beschreven voor de bepaling van formaldehyde in het watercompartiment. De volgende normmethoden werden teruggevonden in de literatuur.

US EPA method 8315A (1996) – Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC)

Principe

Deze methode beschrijft de werkwijze voor de bepaling van vrije carbonylverbindingen, waaronder formaldehyde, in verschillende matrices na omzetting tot overeenkomstige dinitrofenylhydrazonen. Er wordt gebruik gemaakt van HPLC-UV detectie voor de identificatie en kwantificatie van de verbindingen.



Toepassingsgebied

De methode is geschikt voor alle soorten waters en voor het concentratiegebied van 40 tot 2500 µg/L. Voor ongekende waters dient een confirmatie te gebeuren met een andere techniek (bv. GC-MS).

Werkwijze

Een gekend volume water (bv. 100 mL) wordt gebufferd op pH 5 en dinitrofenylhydrazine (DNPH) wordt toegevoegd. De gederivatiseerde verbinding wordt geëxtraheerd met vaste fase extractie (SPE), gevolgd door elutie met ethanol, of vloeistof-vloeistofextractie (LLE) met dichloormethaan. De extracten worden verder opgeconcentreerd en vervolgens, na solventwissel naar acetonitrile, geanalyseerd met HPLC-UV. De piek geregistreerd bij een golflengte van 360 nm en bij de specifieke retentietijd van het formaldehyde-DNPH, wordt geïntegreerd. De kwantificatie gebeurt met de externe standaardmethode, waarbij de kalibratiestandaarden de volledige procedure doorlopen.

De opgegeven methodedetectielimieten in water bedragen 6 resp. 23 µg/L in geval van vaste fase resp. vloeistof-vloeistof extractie.

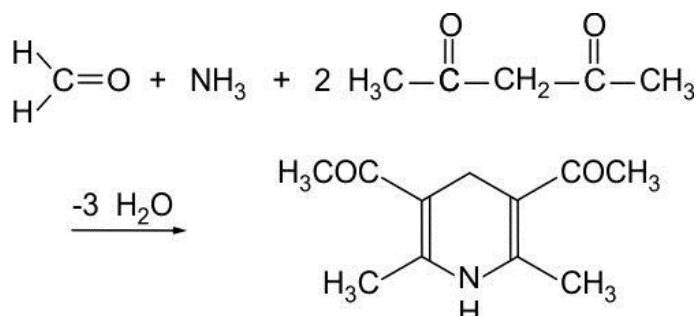
Interferenties

Formaldehyde is een veelvuldig gebruikt reagens en is aanwezig in de laboratoriumomgeving; andere verbindingen aanwezig in reagentia, solventen en materialen kunnen de chromatografie verstoren. Glaswerk dient gereinigd te worden met warm water en detergent en vervolgens met acetonitrile (methanol en aceton kunnen formaldehyde bevatten en dienen vermeden te worden) of door verwarmen in een oven.

D 6303 – 98 Standard Test Method for Formaldehyde in Water

Principe

Deze testmethode is gebaseerd op de Hantzsch reactie. Formaldehyde reageert met acetylaceton in aanwezigheid van ammoniumionen tot vorming van 3,5-diacetyl-1,4-dihydro-lutidine. Deze verbinding heeft een intens gele kleur, met een absorptiemaximum bij 412 nm. De reactie is specifiek voor formaldehyde.



Toepassingsgebied

De methode is geschikt voor de bepaling van de concentratie van vrij formaldehyde in monomere vorm in water incl. afvalwater. Het werkgebied van deze methode bedraagt 0,2-7,0 mg / L. Voor monsters met concentraties hoger dan 7 mg /L dient het water verdund te worden voorafgaand aan de analyse. Monsters die tussen 0,02 en 0,5 mg/ L formaldehyde bevatten kunnen bepaald worden gebruikmakend van een 10-cm cel.

Formaldehyde polymeren reageren gedeeltelijk en/of langzaam waardoor deze testmethode niet geschikt is voor analyse van deze verbindingen.

Werkwijze

Aan een testmonster (met een concentratie van 0,2-7 mg/l formaldehyde) wordt een gelijk volume van het acetylaceton reagens toegevoegd. De buis wordt afgesloten, geschud, en in reactie gebracht bij 60 ° C gedurende 10 minuten. Na afkoelen wordt de absorbantie van de oplossing afgelezen bij 412 nm. Gekleurde of troebele monsters worden vóór aflezen van de absorbantie geëxtraheerd met n-butanol waarna de absorbantie van het butanolextract bepaald

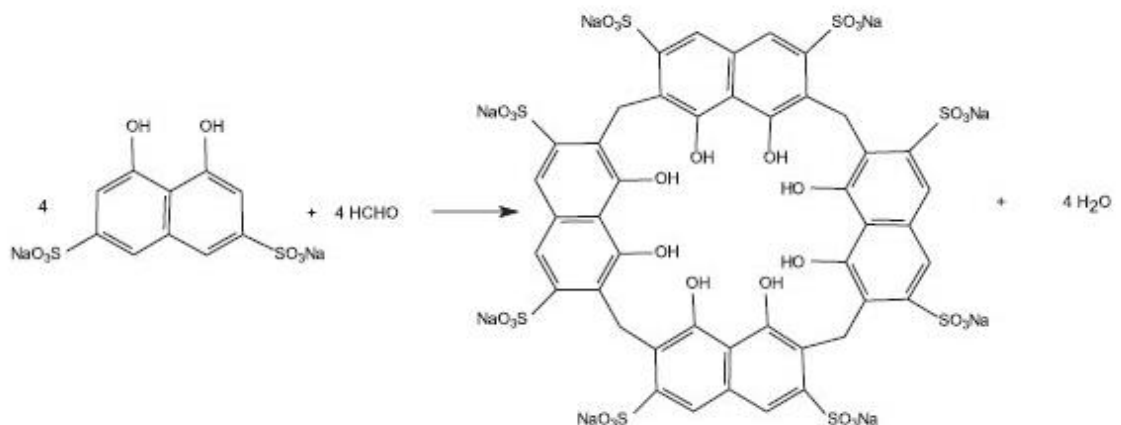
wordt. De concentratie wordt bepaald a.d.h.v. de responsfactor die berekend werd uit de kalibratiecurve van formaldehyde-oplossingen.

Interferenties

- De aanwezigheid van kleurstoffen of troebelheid verstoren de bepaling. De butanolextractie die hierboven beschreven werd kan helpen om de interferentie op het signaal van het lutidinereactieproduct te reduceren.
- Acetaldehyde reageert met vorming van diacetyldihydrocollidine dat een absorptiemaximum heeft bij 388 nm en overlapt met diacetyldihydrolutidine.
- Ethyleenglycol vormt formaldehyde onder deze reactiecondities en leidt dus tot vals positieve resultaten.
- Amines reageren eveneens met acetylaceton, waardoor de resultaten onderschat kunnen worden.
- Periodaat vernietigt de kleur, maar dit kan voorkomen worden door additie van jood en thiosulfaat.
- Formaldehydepolymeren, behalve paraformaldehyde, geven weinig interferentie.
- Phenolen, sulfiet en andere stoffen reageren met formaldehyde.

Opmerkingen

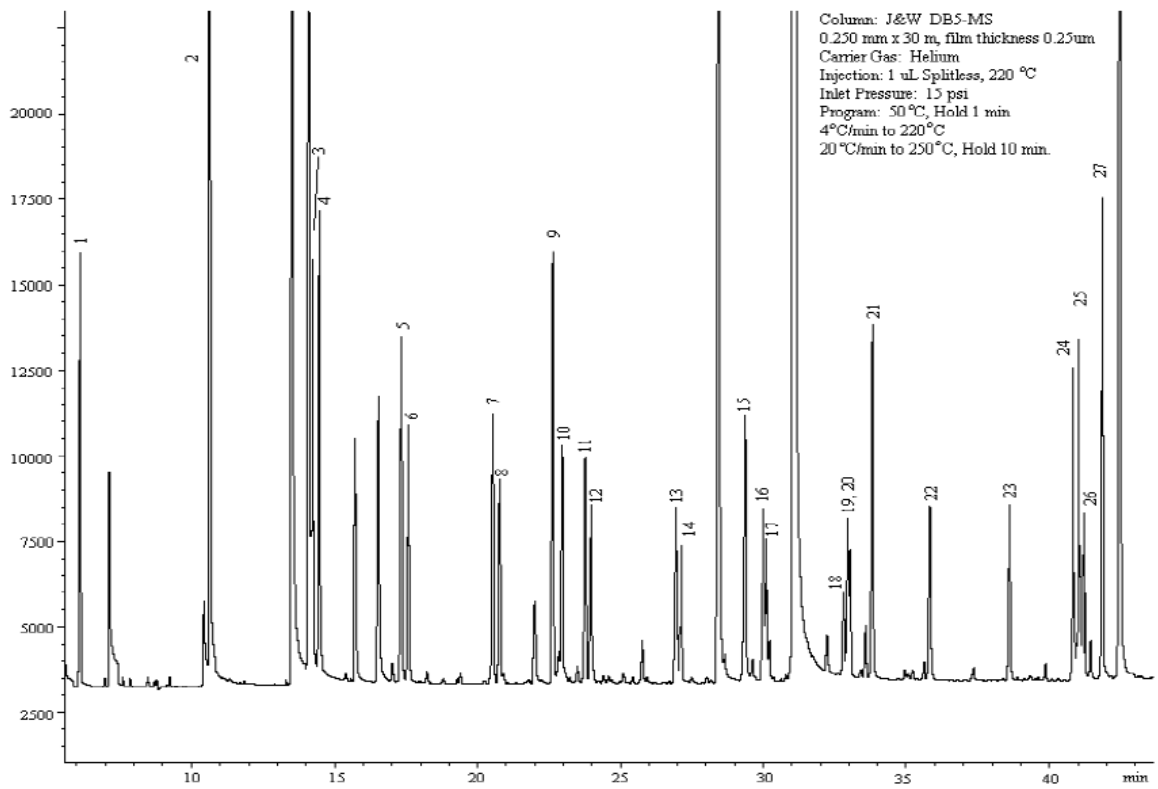
- Deze methode werd in 2007 teruggetrokken en is dus onvoldoende betrouwbaar gebleken.
- Andere kleurreacties zijn in de literatuur beschreven zoals bv.:
 - o 1,3-cyclohexaandion in aanwezigheid van ammoniumionen (zie bv. FLUORAT-02, www.lumex.ru)
 - o Chromotropinezuur (4,5-dihydroxy-2,7-naftaleendisulfonzuur) in aanwezigheid van zwavelzuur; dit reagens werd voorgeschreven in het JRC rapport EUR 24815 EN, voor de bepaling van het gehalte formaldehyde die uitloopt uit keukengereedschap; het gevormde cyclo-tetrachromotropylen wordt spectroscopisch bepaald bij 574 nm. Een stabiel complex kan zich vormen met magnesiumionen, met verschuiving van het absorptiemaximum naar 535 nm (Gasparini, 2008).



Bepaling van formaldehyde met gaschromatografie

Tabel 1: Overzicht van met EPA methode 556 gedetecteerde aldehyden (zie ook het chromatogram in Figuur 1)

ANALYTE	Column A	
	RT (min)	Peak #, Fig 1
Formaldehyde	10.69	2
Acetaldehyde (E)	14.23	3
Acetaldehyde (Z)	14.49	4
Propanal (E)	17.36	5
Propanal (Z)	17.62	6
Butanal (E)	20.58	7
Butanal (Z)	20.81	8
Crotonaldehyde (E)	22.67	9
Crotonaldehyde (Z)	23.00	10
Pentanal (E)	23.82	11
Pentanal (Z)	24.01	12
Hexanal (E)	26.99	13
Hexanal (Z)	27.16	14
Cyclohexanone	29.42	15
Heptanal (E)	30.05	16
Heptanal (Z)	30.16	17
Octanal (E)	33.01	19
Octanal (Z)	33.09	20
Benzaldehyde	33.88	21
Nonanal (E)	35.89	22
Decanal	38.63	23
Glyoxal (peak1)	40.87	24
Glyoxal (peak 2)	41.09	25
Methyl glyoxal (peak 1)	41.22	26
Methyl glyoxal (peak 2)	41.88	27
1,2 dibromopropane (Internal standard)	6.14	1
2',4',5' trifluoroacetophenone (Surrogate)	32.84	18



Figuur 1: Chromatogram van met EPA 556 gedetecteerde aldehyden (zie Tabel 1 voor nummering)

Door Trenholm et al. (Trenholm, 2008) werd een methode ontwikkeld voor de kwantificering van formaldehyde in afvalwater gebruikmakend van vaste fase micro-extractie (SPME) met on-fibre derivatisering, gevolgd door gaschromatografie-massaspectrometrie analyse (GC-MS). De derivatisering gebeurde zoals hierboven met O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA), met vorming van het overeenkomstige pentafluorobenzoyloxime. Deze laatste verbinding werd vervolgens thermisch vrijgesteld en gemeten bij massa 225. Als interne standaard werd aceton-d6 genomen. De methode laat toe formaldehyde te bepalen tot op een niveau van 10 µg/L. De precisie van de methode (RSD) bedraagt 23% voor formaldehyde en slechts 6% voor aceton-d6.

Beranek et al. (Beranek, 2008) vergeleken 3 verschillende SPME werkwijzen (headspace, onderdompeling en on-fibre derivatisering). De detectie gebeurde met GC-MS (formaldehyde kwantificatie-ion 181, confirmatie-ionen 195, 225). De meest geschikte/gevoeligste methode was deze met onderdompeling van de vezel in het waterstaal met derivatiseringsreagens, gevolgd door thermische desorptie van de oximes. De bepalingsgrenzen bedroegen 0.2 tot 55 µg/L. De hoogste waarde gold voor formaldehyde.

2.2.2. BEPALING VAN FORMALDEHYDE IN ANDERE MATRICES

US EPA method 8315A – Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC)

De hierboven beschreven EPA 8315 methode (HPLC bepaling na derivatisering met DNPH) wordt ook ingezet voor de bepaling van formaldehyde in bodem en vaste afvalmonsters na extractie met buffer bij pH5, alsook voor de bepaling van formaldehyde in werkplaatsatmosferen/binnenlucht, na adsorptie van de formaldehyde op een met DNPH geïmpregeneerd patroon, gevolgd door desorptie met acetonitrile.

ISO 17226-1:2008

Leather -- Chemical determination of formaldehyde content -- Part 1: Method using high performance liquid chromatography

Deze methode bepaalt het gehalte aan formaldehyde in een waterig extract van leder gebruikmakend van HPLC na derivatisatie met DNPH. Zowel het vrije als hydrolyseerbare formaldehyde wordt bepaald. De methode is niet gevoelig voor kleurstoffen.

ISO 17226-2:2008

Leather -- Chemical determination of formaldehyde content -- Part 2: Method using colorimetric analysis

Deze methode bepaalt het gehalte aan formaldehyde in een waterig extract van leder gebruikmakend van de colorimetrische bepaling na reactie met acetylaceton. Zowel het vrije als hydrolyseerbare formaldehyde wordt bepaald. De bepaling wordt geïnterfereerd door kleurstoffen.

Opm.: ISO 17226-1 en ISO 17266-2 geven meestal verschillende resultaten, in beide richtingen.

ISO 12460-5:2011

Wood-based panels -- Determination of formaldehyde release -- Part 5: Extraction method (called the perforator method)

Formaldehyde wordt uit de houten panelen geëxtraheerd met kokend toluen; het toluen wordt vervolgens uitgeschud met water, waarna het formaldehydegehalte in het water fotometrisch bepaald wordt met de acetylaceton methode.

ISO 14184-1:2011

Textiles -- Determination of formaldehyde -- Part 1: Free and hydrolysed formaldehyde (water extraction method)

Deze methode bepaalt het gehalte aan formaldehyde in een waterig extract van textiel bij 40°C, gebruikmakend van de colorimetrische bepaling na reactie met acetylaceton. Zowel het vrije als hydrolyseerbare formaldehyde wordt bepaald. Voor gekleurde extracten wordt voorgeschreven om de aanwezigheid van formaldehyde te bevestigen via een bijkomende test met dimedone.

ISO 15373:2001

Plastics -- Polymer dispersions -- Determination of free formaldehyde

Het betreft de bepaling van formaldehyde in verven op waterbasis. Zowel de colorimetrische bepaling met acetylaceton als de HPLC bepaling van het formaldehyde-DNPH zijn beschreven. Volgens deze normmethode wordt alleen het vrije formaldehyde bepaald. De colorimetrische bepaling wordt uitgevoerd voor stalen met formaldehyde concentraties >10 mg/kg, de HPLC-methode voor lagere concentraties en in geval van mogelijke interferentie.

ISO 11402:2004

Phenolic, amino and condensation resins -- Determination of free-formaldehyde content

De bepaling van vrije formaldehyde in fenolharsen gebeurt met potentiometrische titratie (hydroxylamine hydrochloride methode); voor aminoharsen geldt de sulfietprocedure; voor condensatieharsen is de KCN procedure van toepassing.

EN 1541

Paper and board intended to come into contact with foodstuffs - Determination of formaldehyde in an aqueous extract

Deze methode bepaalt het gehalte aan formaldehyde in een waterig extract van papier en karton bij 40°C, gebruikmakend van de colorimetrische bepaling na reactie met acetylaceton. De extractie gebeurt bij kamertemperatuur of met heet water afhankelijk van de bestemming van het papier of karton.

Cosmetica

De bepaling van formaldehyde in cosmeticaproducten is beschreven door Rahman et al. en door Wu et al. (Rahman, 2015; Wu, 2003). Zowel de acetylacetonmethode als de HPLC-methode zijn beschreven. Opvallend zijn de hogere concentraties die met de colorimetrische methode worden bekomen. De colorimetrische methode bepaalt zowel de vrije formaldehyde als de formaldehyde gebonden aan formaldehydedonors; de HPLC methode bepaalt alleen de vrije formaldehyde.

2.2.3. SELECTIE VAN DE MEEST AANGEWENZEN BEPALINGSMETHODE

Op basis van de boven beschreven methoden voor formaldehyde kan gesteld worden dat 2 methoden het meest gangbaar zijn, namelijk de colorimetrische bepaling met acetylaceton en de HPLC-bepaling van het dinitrofenylhydrazonderivaat. Een derde methode, de GC-ECD of GC-MS bepaling van het pentafluorobenzyl derivaat, die een gevoelige methode is, is enkel beschreven voor drinkwater en inputwater voor drinkwaterproductie.

De colorimetrische methode is niet interferentievrij, gekleurde of troebele waters kunnen vals positieve of overschatte resultaten genereren. Een meer selectieve bepaling kan gebeuren met de HPLC-methode, waar bijkomende selectiviteit wordt ingebouwd door chromatografische scheiding. Het voordeel van deze methode is ook dat ze aanleunt bij de methode die gebruikelijk is voor de bepaling van formaldehyde in omgevingslucht, binnenlucht en werkplaatsen. In deze validatiestudie werd dan ook gekozen voor de HPLC-methode.

HOOFDSTUK 3. WERKWIJZE

3.1. ANALYSEMETHODE

Hieronder is de methode beschreven die toegepast werd bij de validatie.

3.1.1. REAGENTIA

- NaOH, 1N (40 g/L)
- Azijnzuur, 5M (300 g/L)
- Natriumacetaat oplossing, 5M (410 g/L)
Opm.: Natriumacetaat lost slecht op. Het poeder langzaam en al roerend toevoegen aan water, dan soniceren bij 60°C (de oplosbaarheid bij kamertemperatuur bedraagt 365 g/L)
- Acetaatbuffer pH 5,0 (5M)
Voeg aan 40 mL azijnzuur (5M) 60 mL natriumacetaat oplossing (5M) toe; pas indien nodig de pH aan met NaOH of HCl
- Acetaatbuffer, 25-voudige verdunning
Leng 10 mL acetaatbuffer aan tot 250 mL met ultrapuurwater
- Verzadigde NaCl oplossing (359 g/L)
- 2,4-dinitrofenylhydrazine (DNPH) oplossing, 3mg/mL
Los 30 mg DNPH op in 10 ml acetonitrile (ACN)
Opm.: DNPH is explosief (warmte en schokgevoelig) en wordt daarom aangeboden, bevochtigd met een hoeveelheid water (gewoonlijk ca 35%)
- Stockstandaard formaldehyde-DNPH (1055 µg/mL); deze standaard is commercieel beschikbaar
- Stockstandaard formaldehyde (1,302 mg/L)
- Acetonitrile, HPLC-kwaliteit
- Mierezuur, HPLC-kwaliteit

3.1.2. MATERIAAL

- SPE-adsorbens: Chromabond C18- 6ml (500 mg) of gelijkwaardig
- Vloeistofchromatograaf (HPLC of UHPLC) met UV-detector, instelbaar op een golflengte tussen 350 en 360 nm.
- Analytische kolom, bv. Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm

3.1.3. MONSTEROPWERKING

- Voeg aan 25mL watermonster 1 mL acetaatbuffer pH 5 toe
- Voeg hieraan 1,5 mL DNPH reagens toe
- Schud het mengsel gedurende een uur bij 40°C
- Voeg daarna onmiddellijk 2,5mL verzadigde NaCl-oplossing toe

- Breng het gederivatiseerde watermonster onmiddellijk op een geconditioneerde SPE kolom; de kolom wordt geconditioneerd met 2,5 mL acetaatbuffer (25-maal verdund); de kolom mag hierna niet droogkomen
- Laat het watermonster doorlopen in 6-10 min
- Zuig het SPE patroon droog gedurende 1 min
- Elueer de formaldehyde-DNPH met 2,5 ml ACN
- Verdun het eluaat 2 maal met ultrapuur water

3.1.4. METING

Injectie :

Injection volume : 10 µL
 Injection type: Full loop
 Sample temperature: 20°C
 Sample loop: 10 µL
 Needle loop: 30µL
 Injection needle type: Peek needle
 Syringe: 100 µL

Kolom : Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm

Kolomtemperatuur: 40°C

Loopvloeistof : A1= WATER
 B1= ACN

Wasoplossing:

Strong wash: ACN / H2O / MeOH / IPA (25/25/25/25) + 0.1% mierzuur
 Strong wash volume: 200 µl
 Weak wash: ACN/Milli Q (30 / 70)
 Weak wash Volume: 600 µL
 Seal wash: ACN/Milli Q (10/90)

Ontgassing : Vacuüm

Eluens (isocratisch):

	WATER	ACN	
Tijd	A1	B1	Debiet
min	%	%	ml / min
0,00	70	30	0,40
5,00	70	30	0,40

Detectie: UV, 360 nm

3.1.5. KALIBRATIE-OPLOSSINGEN

Er werd een calibratiereeks aangemaakt van formaldehyde-DNPH in ACN/H₂O (1/1) vertrekkende van een stockoplossing van 1055 µg/mL

Standaard	Concentratie (µg/ml)	Stockoplossing	Volume stock (µl)	Volume ACN/H ₂ O (1/1) (µl)
Tussenverduunning	105,5	LC-SCT-Form 2,4-DNPH-001	100	900
Cal1	0,01055	Cal3	100	900
Cal2	0,05275	Cal4	100	900
Cal3	0,1055	Cal5	100	900
Cal4	0,5275	Cal6	100	900
Cal5	1,055	Cal7	100	900
Cal6	5,275	Tussenverduunning	50	950
Cal7	10,55	Tussenverduunning	100	900

3.2. VALIDATIEPLAN

De validatie werd uitgevoerd door analyse in duplo op 2 verschillende dagen van onderstaande monsters:

- 2 grondwaters van industriële sites
- 1 RWZI effluent
- 2 industriële effluenten van de chemische sector

De monsters werden geanalyseerd:

- Niet geadderd
- Geadderd op het niveau van 300 µg/L formaldehyde
- Geadderd op het niveau van 3000 µg/L formaldehyde

Van elk monster werd het formaldehyde gehalte bepaald en vervolgens de herhaalbaarheid, terugvinding en reproduceerbaarheid voor elk concentratieniveau.

HOOFDSTUK 4. RESULTATEN

4.1. CHROMATOGRAMMEN

Chromatogrammen van een kalibratiestandaard, procedureblanco, grondwater, afvalwater en RWZI-water, deze laatste geaddeerd op het niveau van 0.3 mg/L, zijn weergegeven in bijlage A. Uit het chromatogram van de procedureblanco, dat zichtbaar minder zuiver is dan dat van de aangekochte formaldehyde-DNPH standaard, blijkt de bijdrage van bestanddelen van reagentia, solventen en mogelijk ook SPE-materiaal. De chromatogrammen vertonen min of meer hetzelfde profiel. De piek bij ca 1.05 min behoort toe aan residueel DNPH dat niet verwijderd kon worden met de SPE opzuivering. Het chromatogram van het RWZI-effluent bevat de meeste onzuiverheden. Bij 0.3 mg/L kan de DNPH-formaldehyde piek nog goed gekwantificeerd worden.

4.1. KALIBRATIEDIAGRAM

In Figuur 1 is een kalibratiediagram weergegeven voor kalibratie-oplossingen van formaldehyde-DNPH in ACN/H₂O van 0.01 tot 10 mg/L. Er wordt een zeer goede lineariteit bekomen, met een correlatiecoëfficiënt van 0.999 (r^2) en een maximale residuele afwijking van 4%.

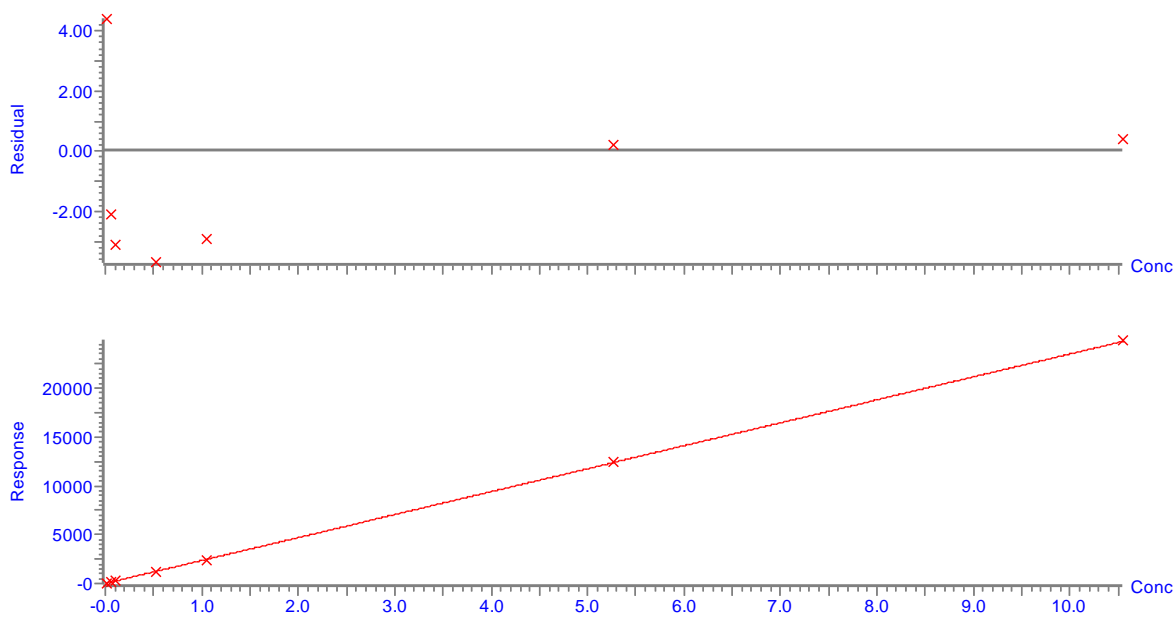
4.2. BEPALING VAN DE TERUGVINDING VAN DE DERIVATISERINGS- EN SPE-OPZUIVERINGSSTAP

Om na te gaan hoe goed de derivatisering en opzuivering werken, werden 3 ultrapuur waters geaddeerd met 1 mg/L formaldehyde. Na additie van DNPH en opzuivering over C18 werd voor elk monster en voor de procedureblanco het formaldehyde-DNPH en hieruit het formaldehyde gehalte bepaald. De terugvindingen werden berekend t.o.v. de geaddeerde waarde. Deze bedroegen 90-93% en zijn goed herhaalbaar (zie Tabel 2).

Dezelfde oefening werd hernomen voor andere concentratieniveaus telkens in duplo (zie Tabel 3). Hieruit blijkt dat goede terugvindingen bekomen worden vanaf concentraties van 0.3 mg/L. De herhaalbaarheid van de duplobepaling is goed.

HOOFDSTUK 4 Resultaten

Compound name: Formaldehyde DNPH
 Correlation coefficient: $r = 0.999942$, $r^2 = 0.999884$
 Calibration curve: $2351.74 * x + -1.69042$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figuur 2: Kalibratiediagram voor formaldehyde-DNPH (concentraties in mg/L)

Tabel 2: Formaldehyde terugvindingen voor addities aan ultrapuur water.

Formaldehyde DNPH	Additie formaldehyde (= 1 mg/l)
	Gehalte ($\mu\text{g/ml}$)
Procedure Bl	0,171
Staal 1	6,514
Staal 2	6,472
Staal 3	6,353

Formaldehyde	Gehalte ($\mu\text{g/ml}$)*	% Terugvinding
Procedure Bl	0,024	
Staal 1	0,931	93,1
Staal 2	0,925	92,5
Staal 3	0,908	90,8

*Omrekening naar formaldehyde: $\text{MM formaldehyde (30.03)} / \text{MM form-DNPH (210.15)}$

Tabel 3: Formaldehyde terugvindingen voor addities aan ultrapuur water (bis).

Formaldehyde DNPH	Gehalte ($\mu\text{g/ml}$)
Procedure BI	0,504
Staal 1 - 0.03 $\mu\text{g/ml}$	1,128
Staal 2 - 0.03 $\mu\text{g/ml}$	1,13
Staal 1 - 0.1 $\mu\text{g/ml}$	1,745
Staal 2 - 0.1 $\mu\text{g/ml}$	1,726
Staal 1 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$	2,968
Staal 2 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$	2,722
Staal 1 - 1 $\mu\text{g/ml}$	7,321
Staal 2 - 1 $\mu\text{g/ml}$	7,858
Staal 1 - 3 $\mu\text{g/ml}$	21,329
Staal 2 - 3 $\mu\text{g/ml}$	21,404
Staal 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$	77,297
Staal 2 - 10 $\mu\text{g/ml}$	74,518

Formaldehyde	Gehalte ($\mu\text{g/ml}$)	% Terugvinding
Procedure BI	0,072	
Staal 1 - 0.03 $\mu\text{g/ml}$	0,089	297
Staal 2 - 0.03 $\mu\text{g/ml}$	0,089	298
Staal 1 - 0.1 $\mu\text{g/ml}$	0,177	177
Staal 2 - 0.1 $\mu\text{g/ml}$	0,175	175
Staal 1 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$	0,352	117
Staal 2 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$	0,317	106
Staal 1 - 1 $\mu\text{g/ml}$	0,974	97
Staal 2 - 1 $\mu\text{g/ml}$	1,051	105
Staal 1 - 3 $\mu\text{g/ml}$	2,975	99
Staal 2 - 3 $\mu\text{g/ml}$	2,986	100
Staal 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$	10,970	110
Staal 2 - 10 $\mu\text{g/ml}$	10,573	106

4.3. REDUCTIE VAN DE PROCEDUREBLANCO

Er werd nagagaan of toevoeging van een geringere hoeveelheid DNPH reagens en het invoeren van een extra wasstap na SPE extractie tot een verlaging van de blancobijdrage en tegelijk de bepalingsgrens kon leiden. Er werd slechts 1 mL DNPH reagens toegevoegd en de wassing gebeurde met 20 mL acetaatbuffer. In Tabel 4 zijn de waarden bekomen voor de procedureblanco opgelijst. Uit de tabel blijkt dat geen effect op de procedureblanco werd waargenomen.

Tabel 4: Procedureblanco's i.f.v. de opwerkingswijze

	Gehalte mg/L
Procedure BI	0,064
Procedure BI minder DNPH	0,053
Procedure BI met wasstap	0,065

4.4. HERHAALBAARHEID

Tabel 5 toont de resultaten die werden bekomen voor de grondwaters, industriële effluenten en het RWZI effluent, zonder en na additie van resp. 0.3 en 3 mg/L formaldehyde. De bepalingen gebeurden telkens in duplo, op dezelfde dag. De grondwaters en effluenten werden in 3 afzonderlijke meetreeksen opgewerkt en gemeten, op resp. 3/10/2016, 4/10/2016 en 7/10/2016. Uit de tabel blijkt de uitstekende terugvinding van formaldehyde, met waarden 83 tot 113%. De laagste waarden gelden voor grondwater B; voor grondwater R, afvalwater L en het RWZI water gelden terugvindingen van nagenoeg 100%. In de stalen zonder additie werd geen formaldehyde gedetecteerd in een concentratie hoger dan de procedureblanco, behalve in grondwater R. Voor al deze stalen geldt dat de formaldehydeconcentratie kleiner is dan 100 µg/L.

In Tabel 6 werd een globale herhaalbaarheid berekend o.b.v. de resultaten van de duplobepalingen van de geaddeerde monsters. De meetwaarden werden gecorrigeerd voor de procedureblanco van dezelfde meetreeks. Voor het lage concentratieniveau bedroeg de herhaalbaarheid (variatioëfficiënt) 10.6 %, voor het hoge 3.3 %, wat een uitstekend resultaat is.

Tabel 5: Formaldehyde meetwaarden voor de validatiestalen, zonder en met additie van formaldehyde (laag = 0.3 mg/L, hoog= 3 mg/L), en terugvindingen (dag 1)

	Gehalte (mg/L)	% Terugvinding
Procedure BI	0,090	
Grondwater B spike laag A	0,324	93
Grondwater B spike laag B	0,312	89
Grondwater B spike hoog A	2,522	83
Grondwater B spike hoog B	2,736	90
Grondwater B geen spike A	0,038	
Grondwater B geen spike B	0,052	
Grondwater R spike laag A	0,439	96
Grondwater R spike laag B	0,458	103
Grondwater R spike hoog A	3,068	97
Grondwater R spike hoog B	3,256	104
Grondwater R geen spike A	0,156	
Grondwater R geen spike B	0,148	
Procedure BI	0,070	
Industr AW J spike laag A	0,319	87

Industr AW J spike laag B	0,396	112
Industr AW J spike hoog A	3,445	113
Industr AW J spike hoog B	3,420	112
Industr AW J geen spike A	0,056	
Industr AW J geen spike B	0,062	
Industr AW L spike laag A	0,440	116
Industr AW L spike laag B	0,403	105
Industr AW L spike hoog A	3,257	105
Industr AW L spike hoog B	3,261	106
Industr AW L geen spike A	0,096	
Industr AW L geen spike B	0,089	
Procedure BI	0,064	
RWZI spike laag A	0,373	101
RWZI spike laag B	0,376	102
RWZI spike hoog A	3,222	105
RWZI spike hoog B	3,258	106
RWZI geen spike A	0,069	
RWZI geen spike B	0,070	

Tabel 6: Formaldehyderesultaten voor de validatiestalen, na blancoaftrek, en variatiecoëfficiënt (herhaalbaarheid) berekend o.b.v. de duplobepalingen

mg/l	HOOG	LAAG
Grondwater B - A	2,43	0,234
Grondwater R - A	2,98	0,349
Industr AW J - A	3,34	0,214
Industr AW L - A	3,15	0,335
RWZI - A	3,16	0,309
Grondwater B - B	2,65	0,222
Grondwater R - B	3,17	0,368
Industr AW J - B	3,32	0,291
Industr AW L - B	3,15	0,299
RWZI - B	3,19	0,312
CV %	3,3	10,6

4.5. REPRODUCEERBAARHEID EN MEETONZEKERHEID

De reproduceerbaarheid werd bepaald o.b.v. duploresultaten bekomen voor de geaddeerde waters, op laag en hoog niveau, gespreid over 2 verschillende dagen. De nieuwe meetreeks werd opgewerkt op 11/10/2017. De meting gebeurde met herkalibratie met aanmaak van nieuwe kalibratie-oplossingen.

De resultaten van de meetreeks van dag 2 zijn samengevat in Tabel 7. Tegelijk zijn de bekomen terugvindingen aangegeven. In de niet-geaddeerde monsters wordt geen formaldehyde aangetroffen in een concentratie >0.1 mg/L (na aftrek van de blanco), behalve in grondwater R, waar om onduidelijke redenen (labocontaminatie of formaldehydevorming?) een verhoogde concentratie wordt gemeten (0.13 mg/L). Voor het hoge concentratieniveau bedragen de terugvindingen 83-105%, voor het lage 95-120%. Bemerkt dat meer spreiding in de terugvindingen aanwezig is in vergelijking met dag 1.

De terugvindingen van dag 1 en dag 2 zijn samengevat in Tabel 8.

Voor het lage concentratieniveau is de gemiddelde terugvinding op dag 2 hoger dan op dag 1. De bias voor het lage concentratieniveau, berekend over alle monsters, bedraagt 6%, voor het hoge 2%.

In Tabel 9 werd de variatiecoëfficiënt berekend o.b.v. de resultaten van de duplobepalingen uitgevoerd op dag 1 (monsters B) en dag 2. De reproduceerbaarheid bedraagt 6% voor het hoge concentratieniveau en 19% voor het lage. Deze laatste waarde is relatief hoog en geeft aan dat de concentratie van 0.3 mg/l de bepalingsgrens benadert.

De meetonzekerheid werd bepaald als de som van de bias en 2 maal de reproduceerbaarheid. De meetonzekerheid op het niveau van 3 mg/L bedraagt 15%, wat goed is wetende dat de aftoetsing van de meetwaarde dient te gebeuren aan een lozingsnorm van 2 mg/L (verzorgingsinstellingen). Op het niveau van 0.3 mg/L bedraagt de meetonzekerheid 35%.

4.6. BEPALINGSGRENS

De bepalingsgrens werd berekend als 6 maal de standaardafwijking van de formaldehydegehalten bekomen voor het lage concentratieniveau op dag 1 en dag 2 (zie Tabel 9). De bepalingsgrens bedraagt 0.3 mg/L, wat in overeenstemming is met de reproduceerbaarheidsvariatiecoëfficiënt die voor dat concentratieniveau werd bekomen.

Tabel 7: Formaldehyde meetwaarden voor de validatiestalen, zonder en met additie van formaldehyde (laag = 0.3 mg/L, hoog= 3 mg/L), en terugvindingen (dag 2)

	Gehalte (mg/L)	% Terugvinding
Procedure BI	0,079	
Grondwater B geen spike	0,064	
Grondwater B spike laag	0,388	108
Grondwater B spike hoog	2,983	97
Grondwater R geen spike	0,213	
Grondwater R spike laag	0,499	95
Grondwater R spike hoog	2,696	83
Ind effl J geen spike	0,100	
Ind effl J spike laag	0,461	120
Ind effl J spike hoog	3,487	113
Ind effl L geen spike	0,129	
Ind effl L spike laag	0,489	120
Ind effl L spike hoog	3,164	101
RWZI geen spike	0,093	
RWZI spike laag	0,434	114
RWZI spike hoog	3,244	105

Tabel 8: Overzicht van de terugvindingen voor formaldehyde voor dag 1 en dag 2

	Dag 1	Dag 2
Grondwater B spike laag A	94,1	108,2
Grondwater B spike laag B	90,1	
Grondwater B spike hoog A	83,3	97,3
Grondwater B spike hoog B	90,6	
Grondwater R spike laag A	96,7	95,2
Grondwater R spike laag B	103,1	
Grondwater R spike hoog A	98,1	82,8
Grondwater R spike hoog B	104,4	
Industr AW J spike laag A	87,6	120,3
Industr AW J spike laag B	113,4	
Industr AW J spike hoog A	113,9	112,9
Industr AW J spike hoog B	113,1	
Industr AW L spike laag A	117,1	120,0
Industr AW L spike laag B	104,7	
Industr AW L spike hoog A	106,5	101,2
Industr AW L spike hoog B	106,6	
RWZI spike laag A	102,1	113,5
RWZI spike laag B	103,2	
RWZI spike hoog A	106,1	105,0
RWZI spike hoog B	107,3	

Gemiddelde	Dag 1	Dag 2	Dag 1 + Dag 2
gemiddelde laag	101	111	106
gemiddelde hoog	103	100	102

Tabel 9: Formaldehyderesultaten voor de validatiestalen, na blancoaftrek, en variatiecoëfficiënt (reproduceerbaarheid) berekend o.b.v. duplobepalingen op 2 verschillende dagen

	mg/l	HOOG	LAAG
Dag 1	Grondwater B - A	2,65	0,222
	Grondwater R - A	3,17	0,368
	Industr AW J - A	3,32	0,291
	Industr AW L - A	3,15	0,299
	RWZI - A	3,19	0,312
Dag 2	Grondwater B - B	2,97	0,318
	Grondwater R - B	2,67	0,430
	Industr AW J - B	3,48	0,392
	Industr AW L - B	3,15	0,421
	RWZI - B	3,23	0,364

	CV %	6,6	19,4
	Meetonzekerheid %	15	35

	Stand.dev. mg/L		0,05
	Bepalingsgrens mg/L		0,3

HOOFDSTUK 5. COMPENDIUMPROCEDURE

In bijlage B is een ontwerp compendium procedure opgenomen. In deze procedure is de werkwijze integraal overgenomen zoals ze in het kader van deze validatiestudie werd toegepast. Naast de gebruikelijke kwaliteitscontroles werden de volgende bijkomende controles ingebouwd:

- Voor monsters die mogelijk hoge concentraties bevatten van andere carbonylverbindingen, die ook reageren met DNPH, dient nagegaan te worden of de omzetting van formaldehyde naar formaldehyde-DNPH volledig is (m.a.w. of de overmaat DNPH niet opgebruikt is). Deze controle gebeurt door additie van formaldehyde aan het monster en de bepaling van de terugvinding.
- De bepaling van formaldehyde-DNPH met LC-UV op de specifieke golflengte van de verbinding is selectief. Desalniettemin is verstoring van het signaal mogelijk door coëluerende verbindingen die licht absorberen in hetzelfde golflengtegebied. In geval van twijfel dient overgegaan te worden op een LC-MS –analyse, met verificatie van de geregistreerde massa's.

In Figuur 1 en Figuur 2 zijn UPLC-PDA en UPLC –MS chromatogrammen en spectra opgenomen voor resp. een kalibratiestandaard en een afvalwaterstaal met een lage formaldehydeconcentratie. De LC-MS analyse gebeurde met een Waters Acquity UPLC – Quattro Premier instrument. De acquisitie gebeurde in negatieve electrospray modus.

Het UPLC-PDA chromatogram van de standaard is zuiver, met een duidelijk absorptiespectrum met een maximum bij 355 nm. Het LC-MS total ion chromatogram toont de aanwezigheid van een belangrijke fractie ioniseerbare verbindingen, die niet waargenomen werden met UV-detectie. Het spectrum van de piek bij de retentietijd van formaldehyde-DNPH (Rt 2.37 min) heeft nagenoeg als enige massa 209, overeenkomend met het gedeprotoneerde moleculaire ion. Bij selectie van dit ion wordt een zuiver chromatogram bekomen. Bemerkt de shift in retentietijd t.o.v. het UPLC-PDA chromatogram; de massaspectrometer is in serie geplaatst met de PDA detector en de piek wordt iets later gedetecteerd.

Voor het afvalwater is het UPLC-PDA chromatogram minder zuiver, er worden bijkomende pieken waargenomen waaronder dat van het derivatiseringsreagens. De piek bij 2.31 min wordt geflankeerd door een grotere piek bij 2.37 min. UPLC-MS analyse leert dat formaldehyde wel degelijk aanwezig is, er wordt bij m/z 209 een duidelijke piek waargenomen voor formaldehyde-DNPH; het onderliggende massaspectrum is ook zuiver. De UPLC-PDA piek bij 2.31 min kan ondubbelzinning gekwantificeerd worden.

De massaspectrometrische bepaling van formaldehyde-DNPH kan ook gebeuren in LC-MS/MS modus, met volgende MRM transitities: 209 > 263, 209 > 133.

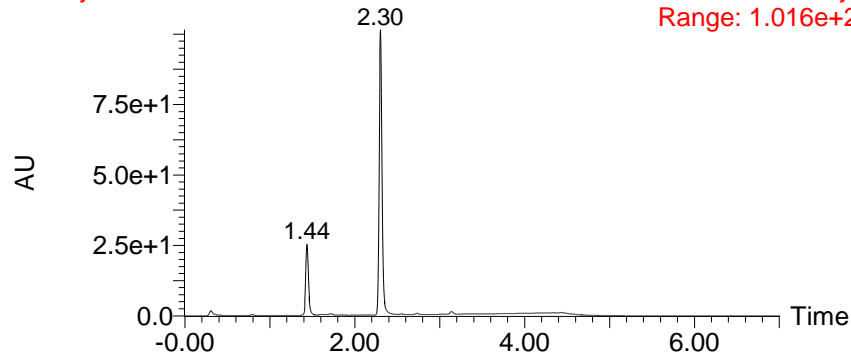
Figuur 3: Formaldehyde-DNPH UPLC-PDA en UPLC-MS chromatogrammen en spectra voor een kalibratiestandaard van 10 mg formaldehyde-DNPH/L

UPLC-PDA chromatogram

Aldehyden20170320a002

Aldehyden20170320a002

2: Diode Array
Range: 1.016e+2

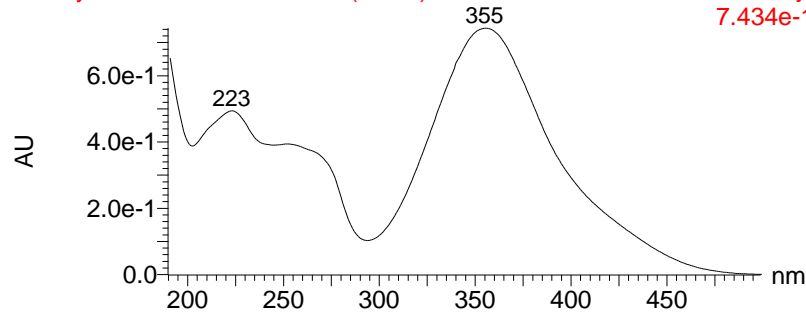


UV-spectrum

Aldehyden20170320a002

Aldehyden20170320a002 693 (2.307)

2: Diode Array
7.434e-1

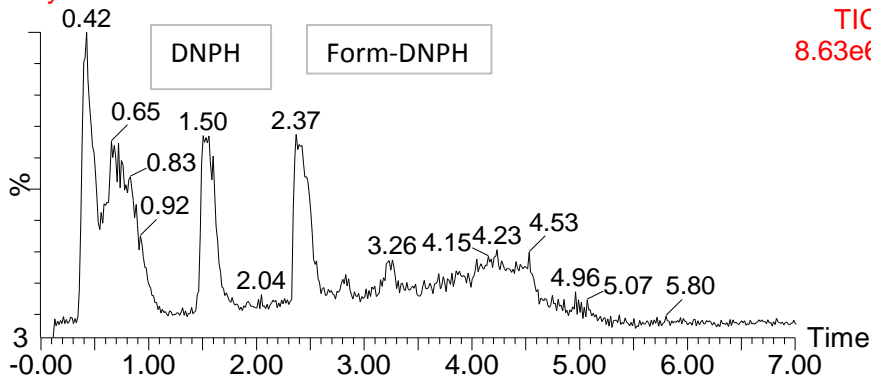


UPLC-MS total ion chromatogram

Aldehyden20170320a002

Aldehyden20170320a002

1: Scan ES-
TIC
8.63e6

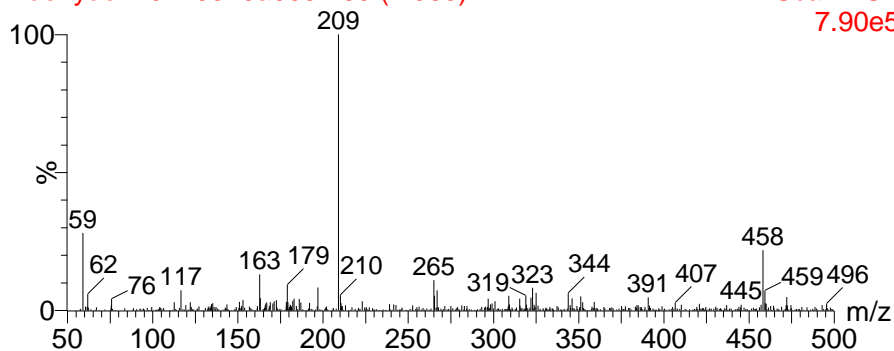


MS spectrum bij Rt 2.83 min

Aldehyden20170320a003

Aldehyden20170320a003 169 (2.383)

1: Scan ES-
7.90e5

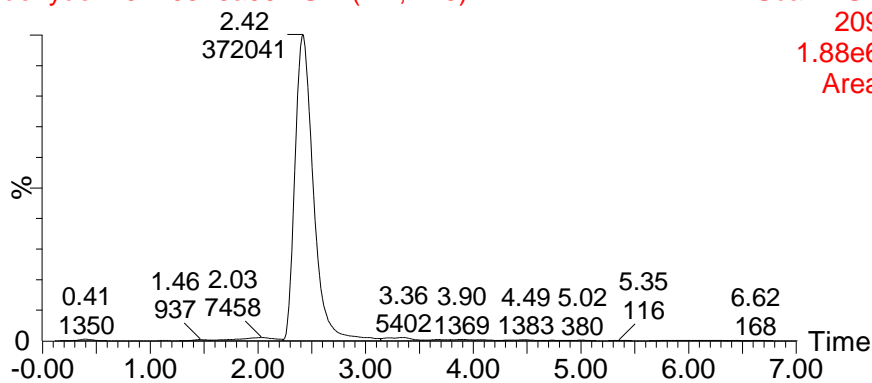


UPLC-MS selected ion chromatogram (m/z 209)

Aldehyden20170320a002

Aldehyden20170320a002 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES-
209
1.88e6
Area

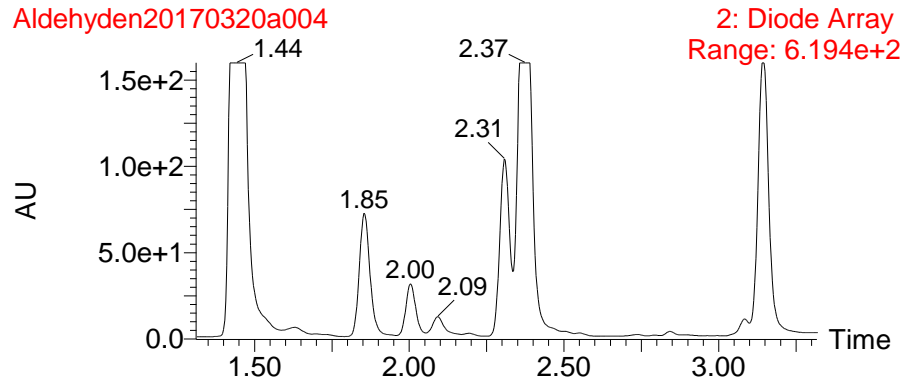


Figuur 4: UPLC-PDA en UPLC-MS chromatogram voor een afvalwaterstaal met een concentratie van 0.6 mg formaldehyde/L

UPLC-PDA chromatogram

Aldehyden20170320a004

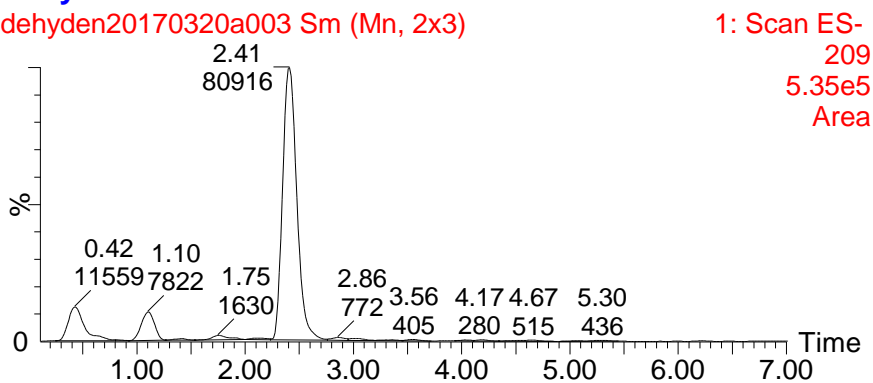
Aldehyden20170320a004



UPLC-MS selected ion chromatogram (m/z 209)

Aldehyden20170320a003

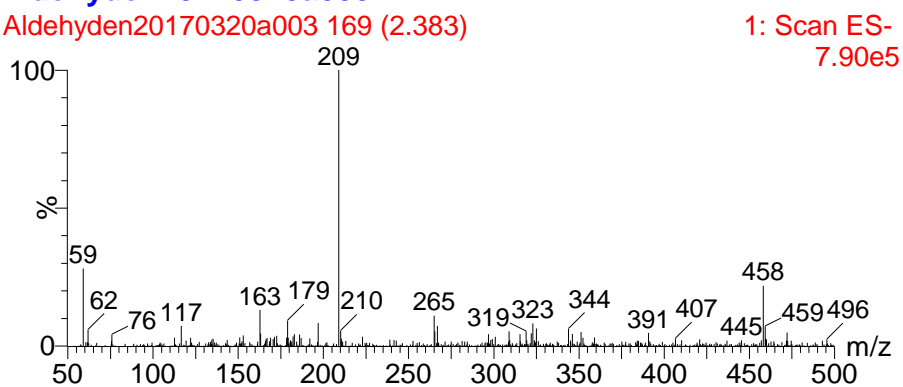
Aldehyden20170320a003 Sm (Mn, 2x3)



MS-spectrum bij 2.41 min

Aldehyden20170320a003

Aldehyden20170320a003 169 (2.383)



HOOFDSTUK 6. BESLUIT

Op basis van de resultaten van deze validatiestudie kan besloten worden dat de bepaling van formaldehyde op een betrouwbare wijze kan gebeuren voor de toetsing aan de VLAREM lozingsnorm van 2 mg/L. De methode vereist een derivatisering en SPE opzuivering/opconcentrering, maar wordt gevolgd door een eenvoudige detectie met LC-UV; deze techniek laat een gemakkelijke kalibratie en kwantificatie toe. Voor complexe afvalwaters kan een bevestigingsanalyse met LC-MS wenselijk zijn. De methode werd opgenomen in een WAC-procedure. Deze zal eerst als ontwerpmethode gepubliceerd worden om na evaluatie op basis van praktijkmonsters definitief gemaakt te worden, na al dan niet doorvoeren van gewenste aanpassingen.

LITERATUURLIJST

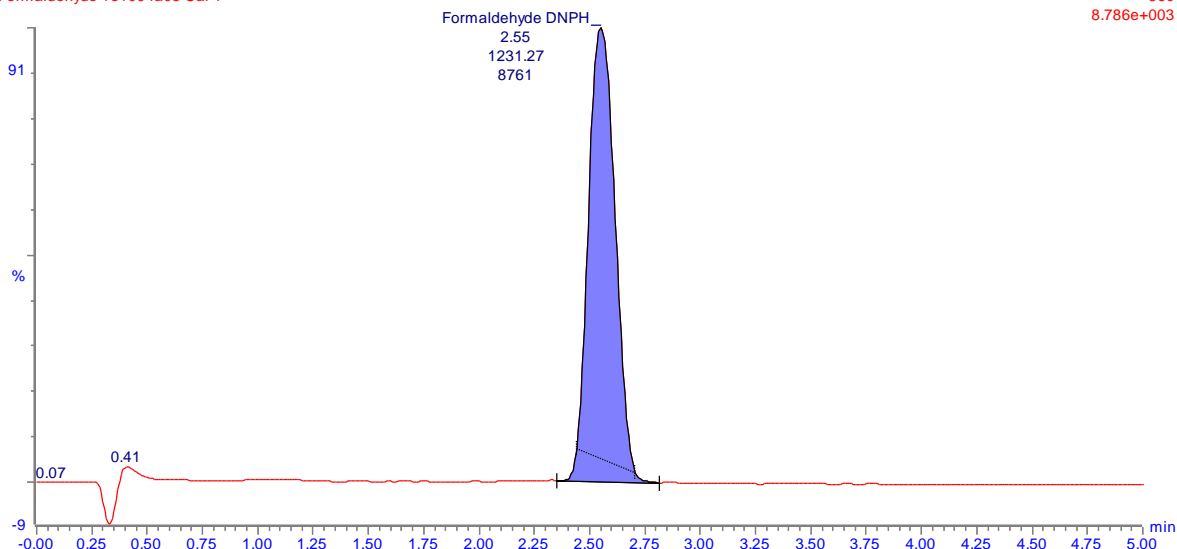
- Josef Beránek, Alena Kubátová, Evaluation of solid-phase microextraction methods for determination of trace concentration aldehydes in aqueous solution, *Journal of Chromatography A*, Volume 1209, Issues 1–2, 31 (2008), Pages 44–54
- Rebecca A. Trenholm, Fernando L. Rosario-Ortiz, Shane A. Snyder, Analysis of formaldehyde formation in wastewater using on-fiber derivatization–solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1210 (2008) 25–29
- Md. Motiur Rahman, Harun-or-Rashid, Subrata Bhadra, A. S. Shamsur Rouf, Development and Validation of Colorimetric and RP-HPLC Methods for the Determination of Formaldehyde in Cosmetics, *American Chemical Science Journal* 5(3): 224-237 (2015)
- Pai-Wen Wu, Chieu-Chen Chang, Shin-Shou Chou, Determination of Formaldehyde in Cosmetics by HPLC Method and Acetylacetone Method, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 11, No. 1 (2003) Pages 8-15
- EUR 24185 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection, Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware (2011)
- Fabrícia Gasparini; Patrícia L. Weinert; Liliane S. Lima; Leonardo Pezza; Helena R. Pezza, A simple and green analytical method for the determination of formaldehyde, *J. Braz. Chem. Soc.* vol.19 no.8 (2008)

BIJLAGE A – UPLC-UV CHROMATOGRAMMEN (360 NM)

Standaardoplossing (0.5 mg/L)

Formaldehyde 161004a05 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 161004a05 Cal 4

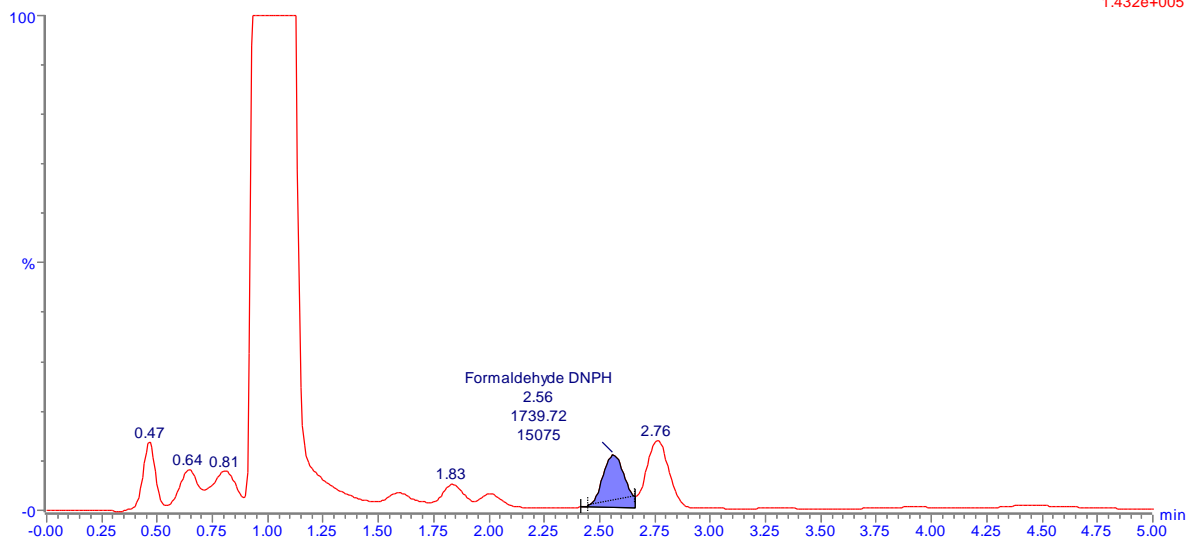
Diode Array,
360
8.786e+003



Procedureblanco

Formaldehyde 161004a12 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 161004a12 Procedure BI

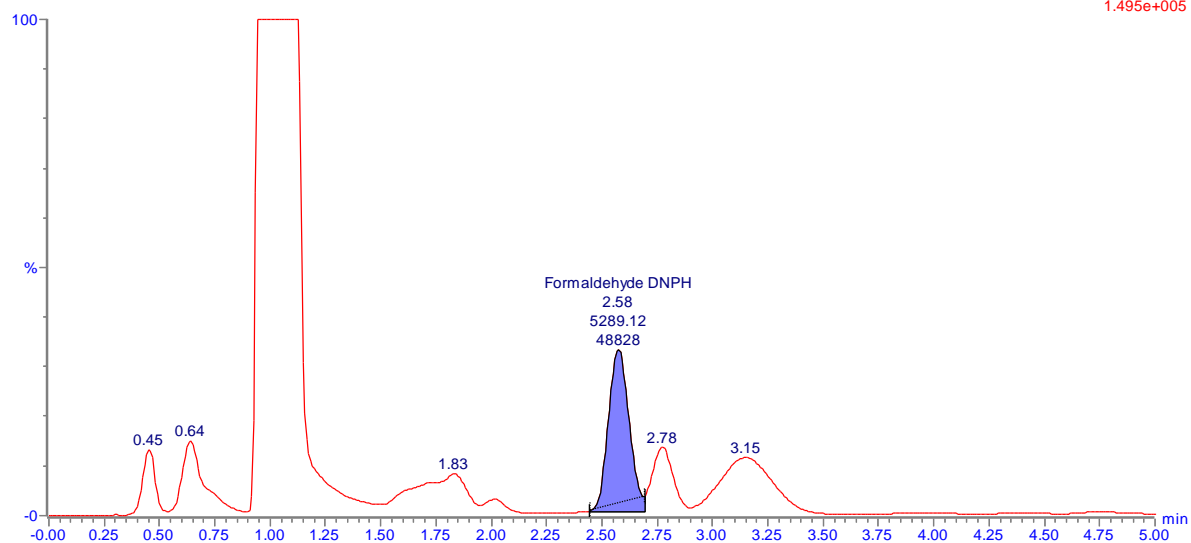
Diode Array,
360
1.432e+005



Grondwater (industriële site), 0.3 mg/L

Formaldehyde 161003a11 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 161003a11 Grondwater B spike laag A

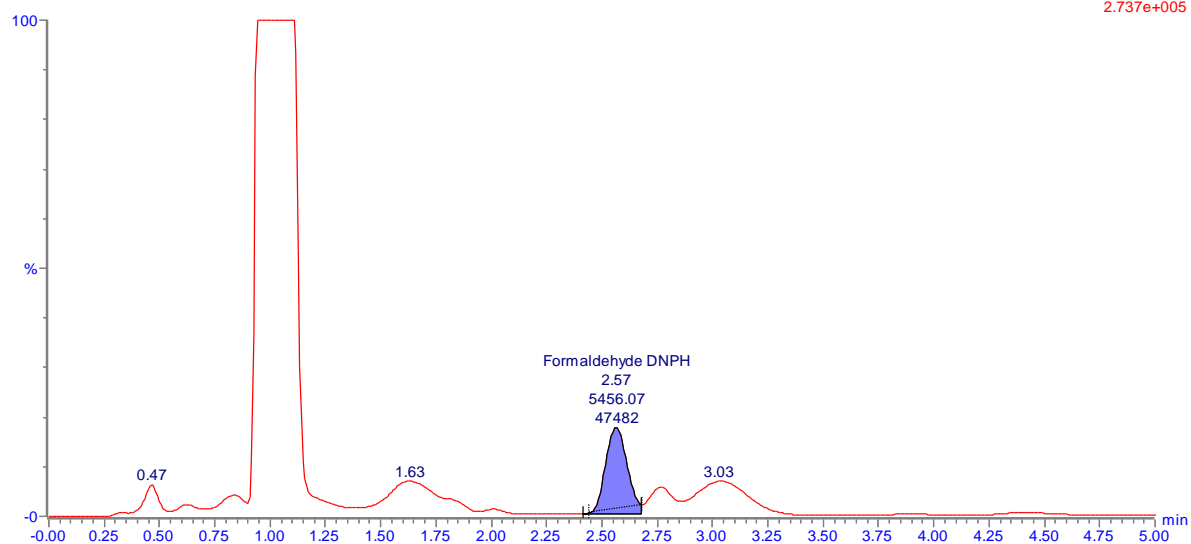
Diode Array,
360
1.495e+005



Industrieel effluent (chemie), 0.3 mg/L

Formaldehyde 161004a13 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 161004a13 Industr AW J spike laag A

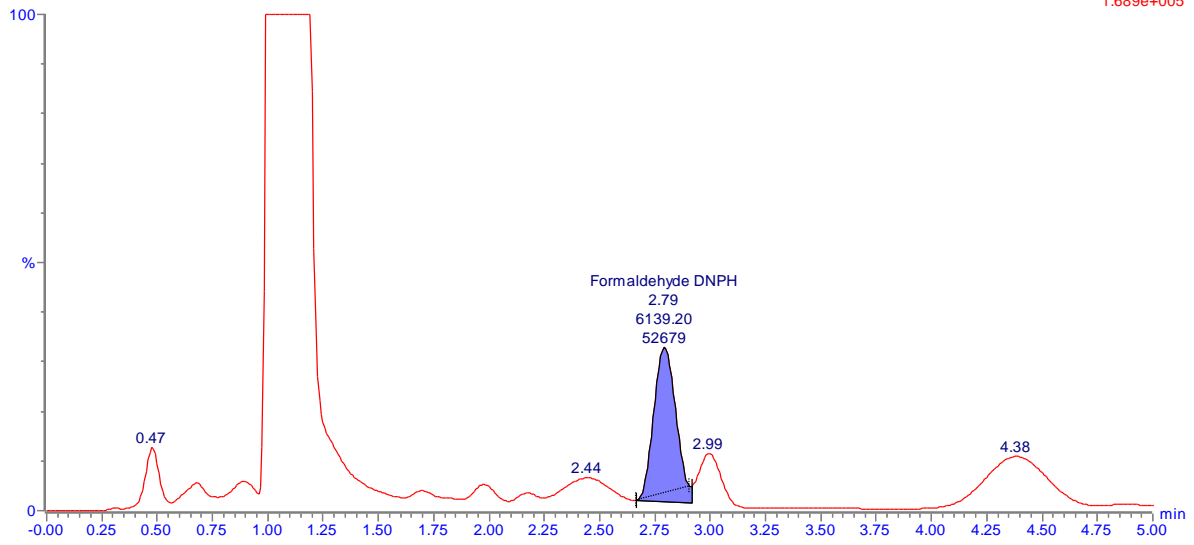
Diode Array,
360
2.737e+005



RWZI-effluent, 0.3 mg/L

Formaldehyde 161007a11 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 161007a11 RWZI spike laag A

Diode Array,
360
1.689e+005



BIJLAGE B: WAC/IV/A/007 – BEPALING VAN FORMALDEHYDE IN WATER - ONTWERP

**Oppuntstelling en validatie van een
bepalingsmethode voor formaldehyde in water**
Ontwerp

INHOUD

1	Toepassingsgebied	35
2	Principe	35
3	Apparatuur en materiaal	35
4	Reagentia en standaarden	35
5	Monsterneming en -bewaring	36
6	Monsteropwerking	37
7	(U)HPLC-analyse	37
7.1	<i>Meting</i>	37
7.2	<i>Identificatie en integratie</i>	38
7.3	<i>Kalibratie</i>	38
7.4	<i>Gehalte formaldehyde in het watermonster</i>	38
8	Kwaliteitscontrole	39
9	Veiligheid	39
10	Referenties	39
BIJLAGE 1	Voorbeeld van een chromatogram van formaldehyde-DNPH in afvalwater (1 mg/L)	
	41	

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor de derivatisatie, extractie en meting van formaldehyde in water. De methode is toepasbaar voor grond- en afvalwater vanaf een concentratie van 300 µg/l.

Opmerking:

De methode kan uitgebreid worden met andere carbonylverbindingen (zie hiervoor EPA 8315A)

2 PRINCIPE

Een gekend volume water (bv. 25 mL) wordt gebufferd op pH 5 en dinitrofenylhydrazine (DNPH) wordt toegevoegd. De gederivatiseerde verbinding wordt geëxtraheerd met vaste fase extractie (SPE), gevolgd door elutie met acetonitrile. De extracten worden geanalyseerd met een vloeistofchromatograaf uitgerust met een UV-detector. De piek geregistreerd bij een golflengte van 360 nm en bij de specifieke retentietijd van het formaldehyde-DNPH, wordt geïntegreerd. De kwantificatie gebeurt met de externe standaardmethode.

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en - materiaal
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- SPE extractietoestel
- SPE patronen: bv. Chromabond C18, 6ml, 200 mg

Opmerking:

- o Andere SPE fasen zijn mogelijk; validatie-experimenten dienen aan te tonen dat voldoende terugvinding en reproduceerbaarheid wordt bekomen.
- o Ook online SPE kan toegepast worden; hierbij gelden specifieke fasen geschikt voor de SPE module.
- LC-UV systeem bestaande uit:
 - o een vloeistofchromatograaf (HPLC of UHPLC) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
 - o een UV-detector (bv. photodiode array), instelbaar op de golflengte van 350-360 nm
 - o een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: een reversed phase kolom, bv. *Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 µm, 2.1 x 150 mm* voor UPLC-meting of gelijkwaardig

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: LC-kwaliteit
- Acetonitrile (ACN): LC-kwaliteit

- Water: LC-kwaliteit
- Mierezuur, LC-kwaliteit
- NaOH, 1N (40 g/L)
- Azijnzuur, 5M (300 g/L)
- Natriumacetaat oplossing, 5M (410 g/L)
Opm.: Natriumacetaat gaat moeilijk in oplossing. Het poeder langzaam en al roerend toevoegen aan water, dan soniceren bij 60°C
- Acetaatbuffer pH 5,0 (5M)
Voeg aan 40 mL azijnzuur (5M) 60 mL natriumacetaat oplossing (5M) toe; pas indien nodig de pH aan met NaOH of HCl
- Acetaatbuffer, 25-voudige verdunning
Leng 10 mL acetaatbuffer aan tot 250 mL met ultrapuurwater
- Verzadigde NaCl oplossing (359 g/L)
- 2,4-dinitrofenylhydrazine (DNPH) oplossing, 3mg/mL
Los 30 mg DNPH op in 10 ml acetonitrile (ACN)
Opm.: DNPH is explosief (warmte- en schokgevoelig) en wordt daarom aangeboden bevochtigd met een hoeveelheid water (gewoonlijk ca 35%)
- Stockstandaardoplossing van formaldehyde-DNPH (bv. 1 mg/mL in acetonitrile); deze standaard is commercieel beschikbaar
- Kalibratie-oplossingen van formaldehyde-DNPH van 0.05 tot 50 mg/L in acetonitrile/water 1/1
- Stockstandaardoplossing van formaldehyde (bv. 1 g/L in water)

5 MONSTERNEMING EN -BEWARING

Voor de monsterneming en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

- Om de biologische activiteit teniet te doen wordt bij de monsterneming 0.5 g/L CuSO_4 aan het water toegevoegd.
- Aan monsters die actieve chloor bevatten wordt bij de monsterneming 0.5 g/L ammoniumsulfaat of ammoniumchloride toegevoegd; chloor reageert met ammonium tot monochloramine en voorkomt de vorming van additionele carbonylverbindingen
Opm.: de additie van andere chloor reducerende agentia zoals natriumthiosulfaat of ascorbinezuur is niet effectief gebleken.
- De monsterflessen worden volledig gevuld (formaldehyde is vluchtig)
- De monsters worden koel en in het donker bewaard; de houdbaarheid bedraagt 7 dagen.

6 MONSTEROPWERKING

Het watermonster wordt gehomogeniseerd door opschudden en hiervan wordt een representatief deelmonster genomen van bv. 25 mL. Indien nodig wordt het watermonster gefiltreerd over een glasvezelfilter of gecentrifugeerd voorafgaand aan de derivatisatie.

- Voeg aan 25mL watermonster 1 mL acetaatbuffer (pH 5) toe
- Voeg hieraan 1,5 mL DNPH reagens toe
- Schud het mengsel gedurende een uur bij 40°C
- Voeg daarna 2,5mL verzadigde NaCl-oplossing toe
- Breng het gederivatiseerde watermonster onmiddellijk over op een geconditioneerde SPE kolom; de kolom wordt geconditioneerd met 2,5 mL acetaatbuffer (25-maal verdund); de kolom mag hierna niet droogkomen
- Laat het watermonster doorlopen in 6-10 min
- Zuig het SPE patroon droog gedurende 1 min
- Elueer de formaldehyde-DNPH met 2,5 ml acetonitrile
- Voeg 2.5 mL ultrapuur water toe

De houdbaarheid van preparaten, bij bewaring in de koelkast, bedraagt 2 weken.

Interferenties

Formaldehyde is een veelvuldig gebruikt reagens en is aanwezig in de laboratoriumlucht, solventen, reagentia (incl. water), glaswerk en ander laboratoriummateriaal; andere verbindingen aanwezig in reagentia, solventen en materialen kunnen de chromatografie verstoren. Glaswerk dient gereinigd te worden met warm water en detergent en vervolgens met acetonitrile (methanol en aceton kunnen formaldehyde bevatten en dienen vermeden te worden) of door verwarmen in een oven.

7 (U)HPLC-ANALYSE

7.1 METING

Typische toestelinstellingen voor de bepaling van formaldehyde-DNPH zijn hieronder gegeven (UPLC-meting):

Injectie volume : 10 µL

Kolom : Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm

Kolomtemperatuur: 40°C

Loopvloeistof : A = WATER, B = ACN

Elutie (isocratisch):

Tijd	A	B	Debiet
min	%	%	ml / min
0,00	70	30	0,40
5,00	70	30	0,40

Detectie: UV, 360 nm

Een voorbeeld van een chromatogram van een effluent opgenomen met de bovenstaande condities is gegeven in bijlage A.

Opm.:

- Afhankelijk van het gebruikte toestel kan het absorptiemaximum bij iets lagere of hogere golflengte gelegen zijn
- De bepaling van formaldehyde-DNPH met LC-UV op de specifieke golflengte van de verbinding is selectief. Desalniettemin is verstoring van het signaal mogelijk door coëluerende verbindingen die licht absorberen in hetzelfde golflengtegebied. In geval van niet-gekende afvalwaters of bij twijfel dient overgegaan te worden op een LC-MS –analyse, met verificatie van de geregistreerde massa's. Formaldehyde-DNPH wordt in negatieve electrospray modus gedetecteerd bij m/z 209 (LC-MS) ofwel bij de MRM transitities 209>263 en 209>133 (LC-MS/MS).

7.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

Formaldehyde wordt geïdentificeerd op basis van de criteria voor retentietijden zoals vermeld in WAC/VI/A/003.

De geïdentificeerde piek wordt geïntegreerd met de software van het apparaat en manueel geverifieerd.

7.3 KALIBRATIE

Voor de kalibratie wordt verwezen naar WAC/VI/A/003. De kalibratie omvat de injectie van minstens 4 standaardoplossingen van formaldehyde-DNPH of alternatief maakt men gebruik van formaldehydestandaarden die de volledige procedure doorlopen. De kalibratievergelijking heeft een lineair verloop:

$$A = aC + b$$

met

- A = de gemeten piekoppervlakte voor formaldehyde-DNPH in de resp. standaardoplossing
- C = de concentratie van formaldehyde-DNPH in de resp. standaardoplossing in mg/L
- a, b = de coëfficiënten van de kalibratievergelijking voor formaldehyde-DNPH

7.4 GEHALTE FORMALDEHYDE IN HET WATERMONSTER

De concentratie in het monster wordt berekend als volgt:

$$C = \left(\frac{A - b}{a} \right) \times \frac{V_e}{V} \times f$$

met

- C = de concentratie van formaldehyde in het monster in mg/L
- A = de gemeten piekoppervlakte voor formaldehyde-DNPH in het monsterextract
- V_e = het volume van het eindextract in mL
- V = het ingenomen volume van het monster in mL
- a en b = de coëfficiënten van de kalibratievergelijking
- f = de omrekeningsfactor van formaldehyde-DNPH naar formaldehyde ($f = 0.14$)

Opmerkingen:

- Het eindextract bedraagt typisch 5 ml, het monstervolume 25 ml
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient het extract verdund te worden met acetonitrile/water 1/1 en opnieuw gemeten.
- Voor monsters die mogelijk hoge concentraties bevatten van andere carbonylverbindingen, die ook reageren met DNPH, dient nagegaan te worden of de omzetting van formaldehyde naar formaldehyde-DNPH volledig is (m.a.w. of de overmaat DNPH niet opgebruikt is). Deze controle gebeurt door additie van formaldehyde aan het monster en de bepaling van de terugvinding.

8 KWALITEITSCONTROLE

Voor de uitvoering van de kwaliteitscontroles wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

De volgende kwaliteitsparameters zijn van toepassing:

- Controle van de toestelgevoeligheid
- Controle van de responslineariteit en bepaling van het werkgebied
- Controle van de juistheid van de kalibratie-oplossingen (onafhankelijke controlestandaard)
- Bepaling van de blancobijdrage (procedureblanco)
- Bepaling van de terugvinding (controlemonster en/of matrixadditie)

9 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze producten tot een minimum te herleiden.

10 REFERENTIES

US EPA method 8315A (1996) – Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC)

US EPA method 556 - Determination of Carbonyl Compounds in Drinking Water by Pentafluorobenzylhydroxylamine Derivatization and Capillary Gas Chromatography With Electron Capture Detection

BIJLAGE 1 VOORBEELD VAN EEN CHROMATOGRAM VAN FORMALDEHYDE-DNPH IN AFVALWATER (1 MG/L)

Formaldehyde 160905a20 Smooth(Mn,1x2)
Formaldehyde 160905a20 Staal 1 - 1 microg/ml

Diode Array,
360
2.002e+005

