

# Bestimmung aromatischer Amine aus Azofarbstoffen mittels GC/MS unter Verwendung von Chem Elut S-Kartuschen für die unterstützte Flüssigextraktion

## Autor

Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

## Zusammenfassung

Agilent Chem Elut S ist ein Produkt zur Probenvorbereitung, das für die unterstützte Flüssigextraktion (SLE) synthetische Medien verwendet. Diese Studie verwendet Chem Elut S-Kartuschen zur quantitativen Analyse aromatischer Amine aus Azofarbstoffen gemäß der europäischen Methode ISO 14362-1. Eine Kartusche wurde mit einer Natriumcitrat-/Natriumhydroxidlösung, die aromatische Amine enthielt, beladen. Die Lösung wurde 15 Minuten lang dort belassen und dann mit Methyl-tert.-butylether (MTBE) eluiert. Der Extrakt wurde für die GC/MS-Analyse verwendet. Die Methode bestimmte die Amine in einer Konzentration von 30 µg/ml für drei unterschiedliche SLE-Kartuschenformate, die alle eine hohe Wiederfindung (87 bis 119 %) und eine hervorragende Reproduzierbarkeit (< 9 % RSD) erzielten. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei Chem Elut S um leistungsstarke SLE-Produkte für die Bestimmung aromatischer Amine handelt.

## Einführung

Azofarbstoffe sind die industriell am häufigsten verwendeten Farbstoffe; sie machen zwei Drittel aller synthetischen Farbstoffe aus.<sup>1</sup> Viele gängige Produkte wie beispielsweise Textilfasern, Nahrungs- und Arzneimittel sowie Kosmetika verwenden sie als farbgebende Zusatzstoffe. In der Textilherstellung sind bestimmte Azofarbstoffe aufgrund der Gefahr für die Umwelt, die durch den reduktiven Abbau in karzinogene aromatische Amine verursacht wird, verboten.<sup>2</sup>

Die Quantifizierung aromatischer Amine, die aus Azofarbstoffen in Textilien entstehen, ist in der europäischen Methode ISO 14362-1 beschrieben.<sup>3</sup> Der Azofarbstoff wird mit Chlorbenzol unter Rückfluss aus dem Material extrahiert. Das Lösemittel wird danach entfernt. Der Extraktionsrückstand wird zur Reduktion der Azofarbstoffe in aromatische Amine mit Natriumcitrat-/Natriumhydroxidpuffer und Natriumdithionit behandelt. Diese Arbeit untersuchte die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Extraktion mit Chem Elut S durch Hinzufügen der entsprechenden aromatischen Amine zu einer Blindprobe der Natriumcitrat-/Natriumhydroxidlösung.

Bei der herkömmlichen SLE wird eine wässrige Probe auf ein Diatomeenerde (DE) enthaltendes Sorbensbett aufgetragen. Die wässrige Probe legt sich dabei als dünner Film auf das Material. Dann wird ein nicht mit Wasser mischbares Lösemittel auf das SLE-Bett aufgetragen, extrahiert die Zielanalyten mit hoher Effizienz aus der Probe und eluiert sie in ein Sammelröhrchen zur Analyse mit oder ohne Vorbehandlung. Diese Methode bietet gegenüber der konventionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) eine erhebliche Einsparung an Zeit und Arbeitsaufwand und eine bessere Reproduzierbarkeit von Benutzer zu Benutzer.

Die Chem Elut S-Produkte verwenden ein synthetisches Medium, das für die Überwindung der Probleme mit herkömmlichen DE-Sorbentien optimiert ist. Im Gegensatz zu den unregelmäßig geformten DE-Partikeln, die eine erhebliche Variabilität aufweisen und Feinstoffe enthalten, haben die Chem Elut S-Partikel eine enge Partikelgrößenverteilung und enthalten keine Feinstoffe. Die genannten Eigenschaften fördern ideale Fließeigenschaften und eine höhere Reproduzierbarkeit. Darüber hinaus verfügt das Chem Elut S-Sorbens über eine höhere Adsorptionskapazität der Probe als die DE-Sorbentien, bietet dadurch eine effiziente Probenadsorption und reduziert die Gefahr eines Probendurchbruchs. Die drei Chem Elut S-Kartuschenformate (für 5 ml Probe in 20-ml-Format-Röhrchen, für 10 ml Probe in 60-ml-Format-Röhrchen und für 20 ml Probe in 60-ml-Format-Röhrchen) nutzen bei Beladung und Elution die Schwerkraft, was den Arbeitsablauf vereinfacht.

Diese Arbeit bestätigt die hohen Wiederfindungsraten und die gute Reproduzierbarkeit für aromatische Amine mit Chem Elut S-Kartuschen per GC/MS(SIM)-Detektion.

## Experimentelles

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. MTBE wurde von VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA) bezogen. Natriumcitrat-Dihydrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurde zur Herstellung eines 0,06 M Citratpuffers in Wasser verwendet. Natriumdithionit wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde täglich eine Lösung von 200 mg/ml hergestellt. Natriumhydroxid wurde als 50%ige Lösung in Wasser von Sigma-Aldrich bezogen. Die aromatischen Amine und internen Standards wurden als reine Feststoffe und Flüssigkeiten zur Herstellung der Standard-Stammlösungen von Sigma-Aldrich und AccuStandard (New Haven, CT, USA) bezogen. Tabelle 1 führt die Retentionszeiten, CAS-Nummern und GC/MS-Ionen der Zielamine auf.

### Standards und Lösungen

Von jedem Amin wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml je nach Löslichkeit in Wasser oder DMSO hergestellt. Diese Standards wurden dann zu Arbeitsstandards zur Herstellung von Kalibrierlösungen und zum Spiken von Proben zusammengeführt.

### Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien für die Probenvorbereitung

- Agilent Chem Elut S für 5 ml Probe in 20-ml-Format-Röhrchen (Best.-Nr. 5610-2009)
- Agilent Chem Elut S für 10 ml Probe in 60-ml-Format-Röhrchen (Best.-Nr. 5610-2010)
- Agilent Chem Elut S für 20 ml Probe in 60-ml-Format-Röhrchen (Best.-Nr. 5610-2011)
- Sammelflaschen aus Glas, 40 ml und 150 ml
- Eppendorf-Pipetten

## Gerätebedingungen

- Agilent 7890 GC
- Agilent 5977 GC/MSD

Agilent 5977 GC/MSD-Parameter	
GC-Säule	Agilent J&W DB-35ms, 30 m x 250 µm x 0,250 µm (Best.-Nr. 122-3832)
Liner	Ultra Inert, einseitig konisch, splitlos, mit Glaswolle (Best.-Nr. 5190-2293)
Injektionsvolumen	1 µl
Einlasstemperatur	280 °C
Flussrate	2 ml/min, konstanter Fluss
Ofentemperatur	100 °C dann mit 10 °C/min auf 320 °C
Temperatur für weiteren Bereich	320 °C.
MS-Quelle	250 °C.
Temperatur des Quadrupols	180 °C.
MS-Modus	SIM (Ionen siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: Zielamine und interne Standards, Retentionszeiten, SIM-Parameter und Wiederfindungsdaten.<sup>3</sup>

Analyt	CAS-Nr.	Retentionszeit (min)	Quantifizierung (m/z)	Qualifizierung 1 (m/z)	Qualifizierung 2 (m/z)	% Wiederfindung <sup>3</sup>
o-Toluidin	95-53-4	2,783	106	107	89	> 50
4-Chloranilin	106-47-8	4,511	127	129	100	> 70
2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7	4,872	120	135	134	> 70
p-Kresidin	120-71-8	5,224	122	137	94	Keine Daten
3-Chlor-o-toluidin	87-60-5	5,585	141	106	140	> 70
4-Chlor-o-toluidin	95-69-2	5,700	141	106	140	> 70
2,4-Diaminotoluol	95-80-7	7,271	121	122	94	> 50
3-Nitro-p-toluidin	119-32-4	9,268	152	107	135	> 70
2-Naphthylamin	91-59-8	9,326	143	115	116	> 70
2-Aminobiphenyl	90-41-5	9,427	169	168	167	> 70
4-Aminobiphenyl	92-67-1	11,591	169	168	170	> 70
Anthracen-d <sub>10</sub>	1719-06-8	11,784	188	184	189	I.S.
p-Aminoazobenzol	60-09-3	15,200	197	92	120	> 70
4,4'-Oxydianilin	101-80-4	15,836	200	171	108	Keine Daten
4,4'-Diaminophenylmethan	101-77-9	15,937	198	197	106	> 70
Benzidin	92-87-5	16,012	184	185	92	> 70
3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	838-88-0	17,363	226	211	120	Keine Daten
3,3'-Dimethylbenzidin	119-93-7	17,623	212	213	106	Keine Daten
4,4'-Thiodianilin	139-65-1	18,520	216	184	215	> 70
4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin)	101-14-4	18,856	231	266	195	Keine Daten
3,3'-Dimethoxybenzidin	119-90-4	18,973	244	201	229	Keine Daten

## Probenvorbereitung

### Verfahren zur Vorbehandlung der Proben:

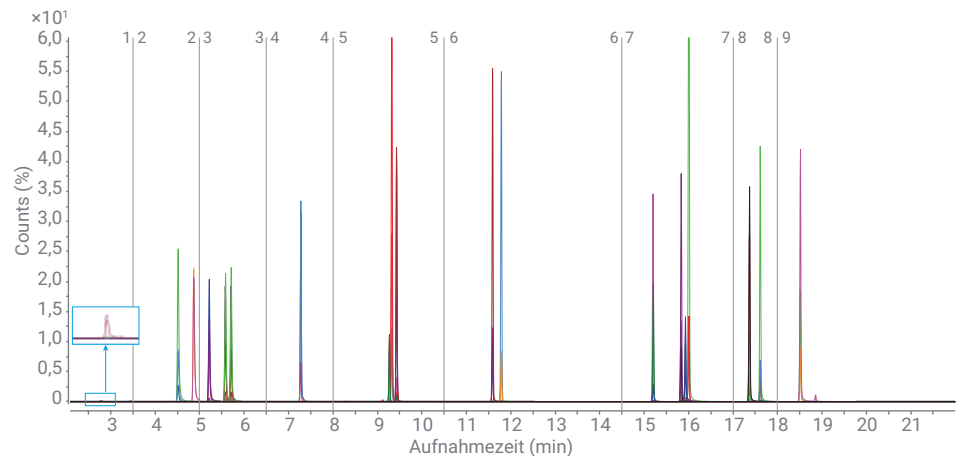
Das Prüfprotokoll E.4.6 wurde gemäß ISO 14362-1 befolgt, um die Extraktionseffizienz der SLE der aromatischen Amine zu bestimmen.<sup>3</sup> Es wurde eine 0,06 M Natriumcitratlösung hergestellt, die mit Natriumhydroxid auf pH 6 eingestellt wurde. Der Probe wurden dann die aromatischen Amine in einer Konzentration von 30 µg/ml hinzugefügt; die Probe wurde vor der unterstützten SLE-Extraktion gut durchmischt. Nach dem Hinzufügen der Amine war die Lösung leuchtend orange/gelb.

### SLE-Verfahren

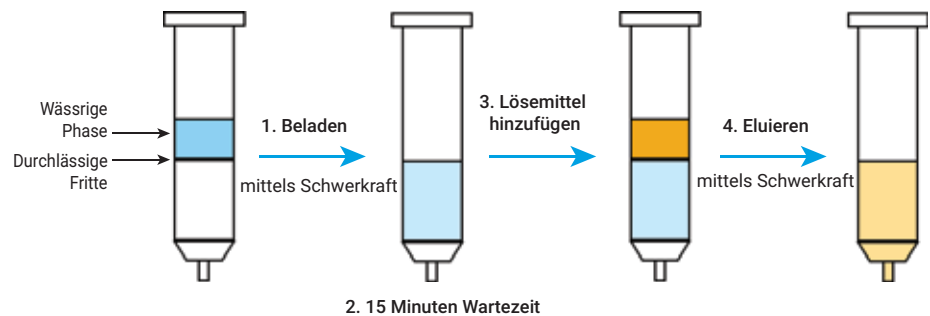
1. Chem Elut S-Kartuschen mit Sammelröhrchen/Sammelflächen aufbauen.
2. Probe auf die Kartusche aufgeben und unter Ausnutzung der Schwerkraft beladen (bzgl. Volumina siehe Tabelle 2).
3. Probe 15 Minuten lang auf dem Medium belassen.
4. Mit Methyl-tert.-butylether unter Ausnutzung der Schwerkraft eluieren (bzgl. Volumina siehe Tabelle 2).
5. Eluat durchmischen und in Probenflaschen für automatische Probengeber zur GC/MS(SIM)-Analyse aliquotieren.

### Auswertung von Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Das Extraktionsprotokoll für aromatische Amine mit Chem Elut S wurde auf Wiederfindung und Reproduzierbarkeit hin untersucht. Für jede Kartusche wurden drei Replikate mit 30 µg/ml, wie in der EN-Methode angegeben, geprüft.<sup>3</sup> Der isotopengekennzeichnete interne Standard (IS) Anthracen-d<sub>10</sub> wurde mit einer Konzentration von 30 µg/ml hinzugefügt, um eine korrekte Volumenkorrektur sicherzustellen. Kalibrierlösungen wurden mit 7,5 µg/ml in MTBE hergestellt, um der 4-fachen Verdünnung, wie im SLE-Verfahren angegeben, Rechnung zu tragen.



**Abbildung 1:** Überlagerung der GC/MS-SIM-Chromatogramme von 20 aromatischen Aminen und internem Standard bei 7,5 µg/ml.



**Abbildung 2:** Darstellung des allgemeinen Arbeitsablaufs mit Agilent Chem Elut S. Es werden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt: 1) Beladung mit Probe mittels Schwerkraft, 2) Wartezeit von 15 Minuten, während derer die Probe auf dem SLE-Medium belassen wird, 3) Hinzufügen eines nicht mit Wasser mischbaren Lösemittels zur Extraktion der Analyten und 4) Elution des organischen Lösemittels mittels Schwerkraft.

**Tabelle 2:** Lade- und Elutionsvolumina für die Extraktion aromatischer Amine mittels SLE.

Kartusche	Bestellnummer	Beladungsvolumen (ml)	Elutionsvolumen (ml)
5 ml, 20 ml-Format	5610-2009	5	20
10 ml, 60 ml-Format	5610-2010	10	40
20 ml, 60 ml-Format	5610-2011	20	80

## Ergebnisse und Diskussion

### Ergebnisse der Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

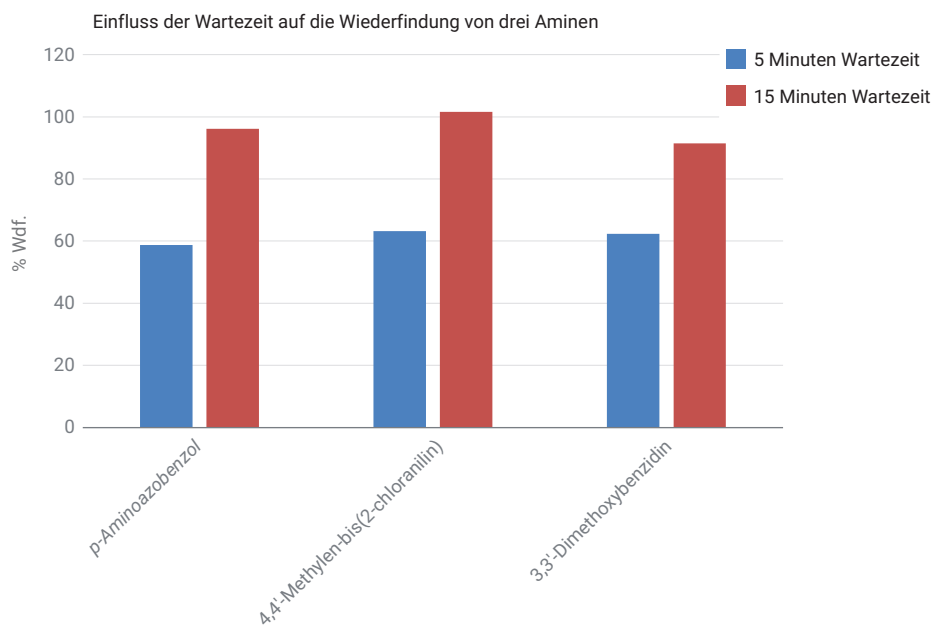
Wie in Tabelle 3 aufgeführt, lieferte die Studie hervorragende Ergebnisse. Die Wiederfindung lag für alle drei untersuchten Chem Elut S-Formate zwischen 87 und 119 % mit einer relativen Standardabweichung < 9 %. Durch die Verlängerung der Wartezeit für die SLE auf 15 Minuten erhöhten sich die Wiederfindungsraten für *p*-Aminoazobenzol, 4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin) und 3,3'-Dimethoxybenzidin um 29 bis 38 % (Abbildung 3). Diese Verbesserungen der Wiederfindung zeigten sich sowohl bei SLE-Röhrchen mit synthetischem Material als auch bei jenen mit Sorbens auf DE-Basis. Alle großformatigen Kartuschen zeigten eine außerordentlich gute Leistung, insbesondere die Kartusche für 10 ml Probe im 60-ml-Format-Röhrchen, die eine hervorragende Reproduzierbarkeit lieferte.

### Probenvorbereitung mit Chem Elut S

Die Chem Elut S-Röhrchen lassen sich einfach und schnell verwenden und erzielen eine hohe Wiederfindung der Analyten sowie eine hervorragende Genauigkeit bei der Analyse aromatischer Amine. Das synthetische Medium wird mit größter Sorgfalt hergestellt, um eine hohe Adsorptionskapazität der Probe, einheitliche Packung, konsistente Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge und optimale Fließeigenschaften zu gewährleisten. Die Chem Elut S-Kartuschen (für 5 ml in 20-ml-Format-Röhrchen, für 10 ml in 60-ml-Format-Röhrchen und für 20 ml in 60-ml-Format-Röhrchen) wurden so entwickelt, dass das Beladen und Eluieren der Proben einfach mit Hilfe der Schwerkraft erfolgen kann. Dieser Applikation kommt eine 15-minütige Wartezeit zugute, durch welche außergewöhnlich gute Wiederfindungsraten für alle Analyten erhalten werden. Im direkten Vergleich waren die Leistungseigenschaften konsistent mit den Sorbenzien auf DE-Basis. Die Produkte liefern eine hervorragende Datenqualität und Matrixentfernung (in Form der Salze) und sind einfach in der Anwendung.

**Tabelle 3:** Wiederfindung und Reproduzierbarkeit karzinogener aromatischer Amine mit Agilent Chem Elut S.

Analyt	Chem Elut S-Format					
	5 ml, 20 ml-Format		10 ml, 60 ml-Format		20 ml, 60 ml-Format	
	% Wdf.	% RSD	% Wdf.	% RSD	% Wdf.	% RSD
<i>o</i> -Toluidin	96,8	5,7	91,9	2,4	91,3	4,5
4-Chloranilin	98,6	3,7	91,3	0,7	92,2	4,7
2,4,5-Trimethylanilin	98,8	3,9	92,2	0,8	93,8	4,3
<i>p</i> -Kresidin	96,9	4,3	90,6	0,8	91,3	3,9
3-Chlor- <i>o</i> -toluidin	97,8	3,7	91,0	1,0	92,3	4,4
4-Chlor- <i>o</i> -toluidin	96,4	3,9	89,8	0,6	90,7	4,7
2,4-Diaminotoluol	96,7	4,4	90,7	0,7	90,6	4,2
3-Nitro- <i>p</i> -toluidin	99,8	4,7	95,0	0,8	94,9	5,0
2-Naphthylamin	97,8	4,3	91,7	0,8	93,0	5,1
2-Aminobiphenyl	96,4	3,4	90,7	0,6	92,8	4,4
4-Aminobiphenyl	97,9	4,3	93,5	0,6	94,1	4,5
<i>p</i> -Aminoazobenzol	98,9	6,2	96,2	0,5	95,3	4,1
4,4'-Oxydianilin	112,9	6,5	109,5	0,8	107,7	5,8
4,4'-Diaminophenylmethan	99,5	6,1	95,3	0,6	95,0	5,5
Benzidin	116,4	5,6	110,4	1,3	111,7	6,1
3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	119,6	2,4	114,0	0,5	113,1	5,3
3,3'-Dimethylbenzidin	103,4	5,4	96,8	0,4	96,8	5,7
4,4'-Thiodianilin	107,4	5,9	101,9	1,0	99,7	5,9
4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin)	107,2	5,8	101,6	1,0	99,6	5,7
3,3'-Dimethoxybenzidin	91,6	6,1	91,5	8,2	87,1	5,8



**Abbildung 3:** Experiment, das den Einfluss der Wartezeit auf die Wiederfindung dreier aromatischer Amine zeigt. Proben, die 30 µg/ml Amine enthielten, wurden mit 10 ml Agilent Chem Elut S in 60-ml-Format-Röhrchen extrahiert (n = 3).

## Abschließende Bemerkungen

Agilent Chem Elut S verwendet ein synthetisches Medium, das mit Blick auf eine konsistente hohe Adsorptionskapazität für wässrige Proben entwickelt wurde. In dieser Studie lieferte Chem Elut S hohe Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeiten für aromatische Amine aus Azofarbstoffen, wie in ISO 14362-1 beschrieben. Alle drei getesteten großformatigen Chem Elut S-Kartuschen zeigten eine hervorragende Leistung und ergaben Wiederfindungsraten von 87 bis 119 % und eine relative Standardabweichung von < 9 % für alle 20 aromatischen Amine. Die Probenvorbereitung mit Chem Elut S wirkt sich bei vielen weiteren Proben- und Analytarten positiv aus, was in anderen Application Notes von Agilent vorgestellt wird.

## Literatur

1. Freeman, H. S. Aromatic Amines: Use in Azo Dye Chemistry. *Front. Biosci.* (Landmark Ed.) **2013**, *18*, 145-164.
2. Pielesz, A.; *et al.* Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *53(1)*, 42-47.
3. Textiles - Methods for Determination of Certain Aromatic Amines Derived from Azo Colorants - Part 1: Detection of the Use of Certain Azo Colorants Accessible with and Without Extracting the Fibres. EN 14362-1:2012, Feb. **2012**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Gedruckt in den USA, 24. Juni 2019  
5994-0951DEE