

# Bestämning av morfolin i luft genom derivatisering med 1-naftylisotiocyanat och vätskekromatografisk analys

*Annika Wästerby och Roger Lindahl*

---

ARBETSLIVSRAPPORT NR 2000:16

ISSN 1400-8211 <http://www.niwl.se/arb/>

Programmet för kemisk yrkeshygien  
Programchef Jan-Olof Levin



*Arbetslivsinstitutet*

## **Förord**

Vid Arbetslivsinstitutet i Umeå har metoder för provtagning av aminer studerats under flera år. Studierna har varit del i arbetet med att utveckla och studera användarvänliga metoder för exponeringskontroll. För provtagning av primära och sekundära aminer har naftyl-isotiocyanat använts som reagens. Föreliggande arbete beskriver validering av en metod för provtagning och analys av morfolin med användning av detta reagens.

Roger Lindahl  
Projektledare

## Innehållsförteckning

Sammanfattning .....	1
English summary .....	1
Inledning .....	2
Material och metoder .....	5
Omkristallisation av NIT .....	5
Syntes av tioureaderivat .....	5
Impregnering av glasfiberfilter.....	5
Spikning av morfolin på glasfiberfilter.....	6
Beläggning av XAD-2 med NIT .....	6
Provtagning av morfolin i gasfas .....	6
Försöksuppläggning för provtagning av morfolin i gasfas .....	8
HPLC-analys .....	8
Bestämning av lagringsstabilitet .....	9
Resultat och diskussion.....	10
Referenser .....	17

## Sammanfattning

Morfolin är en allsidig kemikalie med många användningsområden. Vid nitrosering av morfolin bildas N-nitrosomorfolin, som visats ha mutagen effekt i flera testsystem. En kemisorptionsmetod har utvecklats för mätning av morfolin i luft. Prover samlas in med adsorbenttuber innehållande XAD-2 impregnerad med 1-naftylisotiocyanat. Det bildade 1-naftylisotiocyanatderivatet desorberas med acetonitril och analys utförs med vätskekromatografi och UV-detektion. Utbytet av gasfaspikad morfolin varierade mellan 86-100% med ett medelvärde av 91,3% och relativ standarddeviation 5,2%. Den lägsta mängden spikad morfolin (2,2 µg) motsvarar 7 mg/m<sup>3</sup> (1/10 hygieniska nivågränsvärdet) vid en provtagningsperiod av 15 minuter och provtagningsflödet 20 ml/min. Metoden påverkas inte av relativ luftfuktighet eller mängd morfolin (2-1570 mg). Proverna är stabila i rumstemperatur i minst två veckor.

## English Summary

Morpholine is an extremely versatile chemical with many applications. A method for the determination of morpholine in air has been developed. Samples are collected with adsorbent tubes containing XAD-2 resin coated with 1-naphthylisothiocyanate. The thiourea derivative formed is subsequently desorbed with acetonitrile and analysed with HPLC and UV-detection. The recovery after gas phase spiking with morpholine (2.2-1570 µg) was 91% (86-100%) with a coefficient of variation of 5.5%. No effect on recovery from relative humidity or amount morpholine was seen. The lowest tested amount corresponds to 7 mg/m<sup>3</sup> (1/10 threshold limit value) for a 15 minute sampling period with a sampling rate of 20 ml/min. Samples are stable at room temperature for at least two weeks.

## Inledning

I denna rapport beskrivs en ny metod för provtagning av morfolin i luft. Morfolin är en cyklisk sekundär amin. Behovet av känsliga och snabba metoder för bestämning av olika alifatiska aminer i luft har ökat. Dessa aminer används som råmaterial eller förekommer som mellansteg i produktionen av andra kemikalier, medicinska preparat, polymerer, pesticider, färgämnen och korrosionsskydd (1). Aminer är svåra att provta och analysera eftersom de är känsliga för oxidation och nedbrytning (2). Flera olika metoder används i dag för mätning av aminer i arbetsplatsluft (3). De flesta metoderna använder impinger eller gastvättflaskor med syra för provtagning, men dessa våtkemiska provtagningsmetoder är opraktiska vid exponeringsmätningar.

Fasta sorbenter är att föredra, och provtagning med silikarör följt av eluering med syra och analys med gaskromatografi (GC) har använts för flertalet aminer (4). Den metod som har använts för provtagning av morfolin i luft är adsorption på silikagel, desorption med 0.05 M svavelsyra, varefter en del av provet tas ut och görs basiskt med 1.2 M natriumhydroxid och analyseras på GC (5). Metoden har validerats över haltområdet 28.5-108.4 mg/m<sup>3</sup>, men med en 20-liters provvolym är det praktiska arbetsområdet mellan 7-210 mg/m<sup>3</sup>. Desorptionseffektiviteten måste bestämmas separat. En av nackdelarna med denna metod är att silika har hög affinitet för vatten, så det finns risk att organiska ångor inte fångas effektivt i närvaro av hög luftfuktighet. En annan gaskromatografisk metod för bestämning av morfolin är uppsamling av luft i en evakuerad gaspipett och gasinjektion (6). 100 ppm morfolin kan bestämmas i 2 ml luft.

Metoderna där direkt GC-analys används påverkas negativt av att aminerna har stark adsorption i det kromatografiska systemet (7). Detta problem kan delvis lösas genom att inkorporera kaliumhydroxid i kolonnpackningen (8). GC metoder för direkt analys av aminer på nanogramnivån har utvecklats (8,9). För att förbättra känsligheten (som ofta inte är särskilt hög vid direkta GC-metoder (4)) kan en lämplig derivatisering utföras innan analysen. Vanligt är att bilda fluor-innehållande derivat som tillsammans med ECD (Electron Capture Detection) används för känslig bestämning av aminer (10).

IR instrument kan användas för direktmätning av morfolin i luft. Denna mätmetod är känslig men icke specifik. En nackdel med mätmetoden är att den inte går att använda för personburen provtagning.

Vätskekromatografiska metoder för att analysera aminer begränsas av att den funktionella gruppen (amingruppen) har liten absorptions i det ultravioletta området. Kemisk derivatisering gör det möjligt att bestämma spårmängder av aminer med HPLC (High Performance Liquid Chromatography, vätskekromatografi). En mängd olika derivatiseringsreagens har använts för att öka detektionskänsligheten för aminer. m-Toluoyl klorid (1,11), 3,5-dinitrobenzoyl klorid (12) och NBD-klorid (7-kloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)(13,14) är några av de reagens som finns publicerade för derivatisering av aminer.

Primära och sekundära aminer reagerar med fenylocyanat och bildar N,N-disubstituerade ureaämnen som är stabila, lämpliga att analysera med reversed-phase vätskekromatografi, och har hög absorptions i UV-området(15). Fenylocyanat är dock ganska reaktiv och

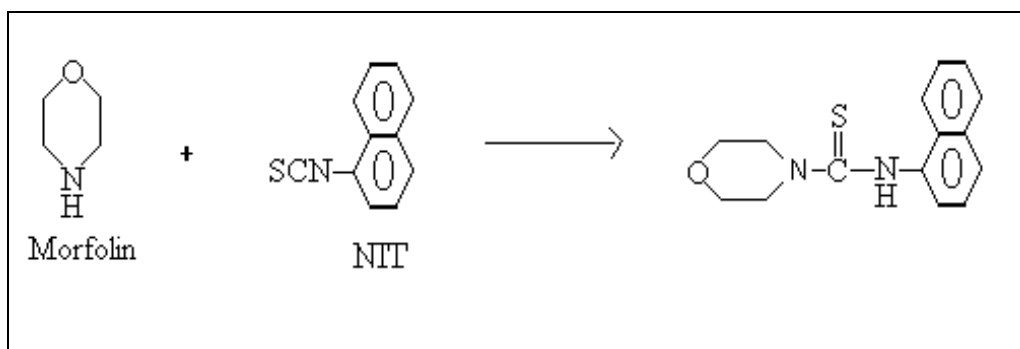
reagerar med föreningar som har ett aktivt väte, som alkoholer, fenoler, karboxylsyror och vatten.

1-naftylisocyanat har använts för att derivatisera alifatiska aminer för analys med HPLC (7), men reagerar med adsorbenten, några lösningsmedel (speciellt alkoholer) och med vatten (2).

Denna metod, som många av de ovan nämnda derivatiseringsmetoderna för HPLC, bygger på våtkemisk provtagning i gastvättflaska eller impinger. En fördel är om reagenset också fungerar bra belagt på en fast adsorbent, då kan kemisorption vara en användbar metod. Vid kemisorption adsorberas det provtagna ämnet på en fast adsorbent och reagerar samtidigt med ett reagens som i förväg applicerats på adsorbenten (3). Kemisorption gör det möjligt att provta ämnen som är för reaktiva för adsorptionsprovtagning. När derivatisering av aminen sker direkt vid provtagningen, stabiliseras analyten. Detta underlättar transporter och lagring innan analys (2).

1-naftylisotiocyanat (NIT) visade sig reagera snabbt och kvantitativt med primära och sekundära aminer och bilda ett stabilt tioureaderivat, samtidigt som NIT inte reagerade med varken adsorbenten eller de använda lösningsmedel (2). En metod för pumpad provtagning av gasformiga primära och sekundära aminer har utvecklats vilken använder Amberlite XAD-2 belagd med NIT (16). Denna metod har validerats för flera olika aminer (2,17,18,19). Det finns andra publikationer där kemisorptionstekniken med andra reagens har använts för provtagning av aminer. Elskamp et al (14) impregnerade XAD-7 med NBD-klorid och analyserna utfördes med HPLC med användandet av både UV-och fluorescensdetektion. Resultaten som erhöles vid detta första test verkade lovande.

Denna rapport beskriver pumpad provtagning med NIT-belagd XAD-2 för bestämning av morfolin i luft. Morfolin reagerar med NIT enligt figur 1:



Figur 1. Derivatisering av morfolin med NIT

Det bildade tioureaderivatet desorberas och analyseras med HPLC (UV-detektion). Reagenset NIT behöver inte avskiljas eller destrueras före analys då det har större fördröjning i det kromatografiska systemet och eluerar efter aminderivatet. Fördelar med metoden är att den är enkel och snabb. Inga vätskor är inblandade vid provtagningen och genom att derivatiseringen sker direkt vid provtagningen stabiliseras analyten. Derivatiseringen ger också förutsättning för en känslig analys.

Morfolin är en basisk, oljig, flyktig och hygroskopisk vätska med karakteristisk aminlukt, som är blandbar med vatten och löslig i de flesta organiska lösningsmedel. Morfolin är en allsidig kemikalie som har många olika användningsområden. I internationella översikter anges de viktigaste användningsområdena för morfolin vara som råvara vid tillverkning av tillsatsmedel för gummiindustrin, antikorrosionsmedel, vid produktion av optiska vitmedel, färger, växtskyddsprodukter och läkemedel. Morfolin används också i kosmetika och hygienprodukter som emulgerings- och ytspänningsnedsättande medel (20,21). I Sverige användes 1994 ca 21 ton morfolin. Ingen tillverkning av råvaran morfolin sker i Sverige (20).

NIOSH uppskattade att 117 000 arbetare i USA var potentiellt exponerade för morfolin under åren 1981-83. Nivågränsvärdet (NGV) för exponering under en åtta timmars arbetsdag är  $70 \text{ mg/m}^3$ . Det finns inte mycket data gällande exponeringsnivåer i arbetsmiljön. Vid tillverkning av rostskyddsmedel i Sverige uppmättes vid personburen mätning halter på  $<0.1-0.2 \text{ mg/m}^3$  (20).

Upptaget av morfolin är högt och snabbt genom oskadad hud och via andningsvägarna. Den kritiska effekten för människa vid yrkesmässig exponering för morfolin bedöms vara slemhinnepåverkan. Morfolin är ej mutagent (22). Morfolin kan nitroseras i kemiska produkter, samt in vitro och in vivo. N-nitrosomorfolin kan bildas genom att vattenlösningar med nitrit reagerar med morfolin, eller genom reaktion mellan gasformiga kväveoxider och vattenlösningar av morfolin (20, 23). I försöksdjur nitroseras morfolin av tillfört nitrit. Data över nitrosering in vivo hos människa saknas dock. Då morfolin sattes till human saliv med normalt nitritinnehåll och med pH 7 bildades N-nitrosomorfolin (22). Morfolin nitroserades också snabbt i normal human magsaft med pH nära 3 vid tillsats av nitrit. Det finns i realiteten alltid en nitritexponering (via födan) och vissa arbetsmiljöer har också hög halt av kväveföreningar i luft. N-nitrosomorfolin är djurcarcinogen i flera djurslag, och mutagent i olika bakteriesystem (20). Beträffande carcinogen effekt av N-nitrosomorfolin hos människa saknas data.

## Material och metoder

### *Kemikalier*

Morfolin(Puriss)	Kebo Lab AB	Stockholm
1- Naftylisotiocyanat (NIT) (p.a)	Sigma	St Louis MO, USA
Etanol 99.5%	Kemetyl	Haninge
Acetonitril(HPLC grade)	Rathburn	Walkerburn, UK
Vatten (Milli Q plus)	Millipore	Bedford, U.S.A
Metanol (HPLC grade)	Baker	Holland

Servachrom® XAD typ 2 analytiskt ren, 300-1000 $\mu$ , SERVA Heidelberg  
Amberlite® XAD-2, 20-50 Mesh, Fluka AG, Buchs, Schweiz

Servachrom XAD impregnerades direkt, medan Amberlite XAD-2 renades innan beläggningen. För att avlägsna oorganiska salter tvättades polymeren upprepade gånger med milliQ-vatten. Fina partiklar avlägsnades genom dekantering. Polymeren tvättades vidare med metanol fem gånger och extraherades två gånger med acetonitril i en soxhlet apparat i 24 timmar. Polymeren fick slutligen torka vid 70° över natt (24).

För att mäta smältpunkten på derivatet användes Büchi SMP-20 smältpunktsapparat.

### *Omkrystallisation av NIT*

Reagenset renades genom omkrystallisation från absolut etanol. 1-naftylisotiocyanat löstes upp i varm absolut etanol. MilliQ vatten sattes till lösningen tills en vit dimma erhöles. Den heta lösningen filtrerades. Lösningen fick stå i rumstemperatur (alternativt i kyl) så att kristaller föll ut (2). Renheten på dessa kontrollerades genom att en lösning av 0.2 mg/ml injicerades på HPLC systemet. Omkrystallisationen upprepades tills önskad renhet erhöles.

### *Syntes av tioureaderivat*

Referens-tioureaderivatet syntetiserades från NIT och aminen (25). Till en lösning av 500 mg NIT i absolut etanol, droppades en lösning av morfolin i 2 ml etanol. Morfolinlösningen hade tillretts så att det fanns ett litet överskott av amin jämfört med mängden NIT. Blandningen värmdes i ungefär fem minuter och fick sedan stå i rumstemperatur. Kristaller föll omedelbart efter det att morfolinlösningen droppats i, men MilliQ-vatten kan annars tillsättas droppvis för att få kristallisationen att starta. Derivatet omkrystalliserades 1 ggr från absolut etanol. Det syntetiserade tioureaderivatet användes föra att göra analytiska standards i acetonitril. Till varje kalibreringskurva användes standards spädda från minst två invägda stamlösningar.

Standards av morfolin tillreddes också på ett alternativt sätt. Morfolin i acetonitril sattes till en burk med ett NIT-impregnerat filter i 3 ml acetonitril. Standardlösningarna är stabila i flera månader om de förvaras i kylskåp (15,26).

### *Impregnering av glasfiberfilter*

En lösning av 100 mg/ml NIT i acetonitril beredd (16). 13-mm-diameter glasfiberfilter (typ AE, 0.3  $\mu$ m porstorlek, SKC Inc) doppades i lösningen och fick sedan torka. På varje filter hamnar ungefär 70  $\mu$ l. Filtrena förvarades i en tät påse i frys innan de användes. Vid genereringsförsöket användes filterhållare av polypropylen (Millipore, Swinnex-13).



### *Spikning av morfolin på glasfiberfilter*

Aminlösningar med kända koncentrationer bereddades genom att väga upp morfolin och späda med acetonitril. Ett NIT-impregnerat filter stoppades i en provburk och 10 µl aminlösning applicerades på filtret med hjälp av en kalibrerad mikroliter spruta. Efter en timme tillsattes 3 ml acetonitril (HPLC-grade) och lösningen skakades i ungefär 5 minuter. Varje koncentration utgjorde en serie med 6 prov och 2 st blankar. Analysen gjordes på beskrivet HPLC system inom ett dygn. Om analysen inte skedde omedelbart stod lösningen i kyl.

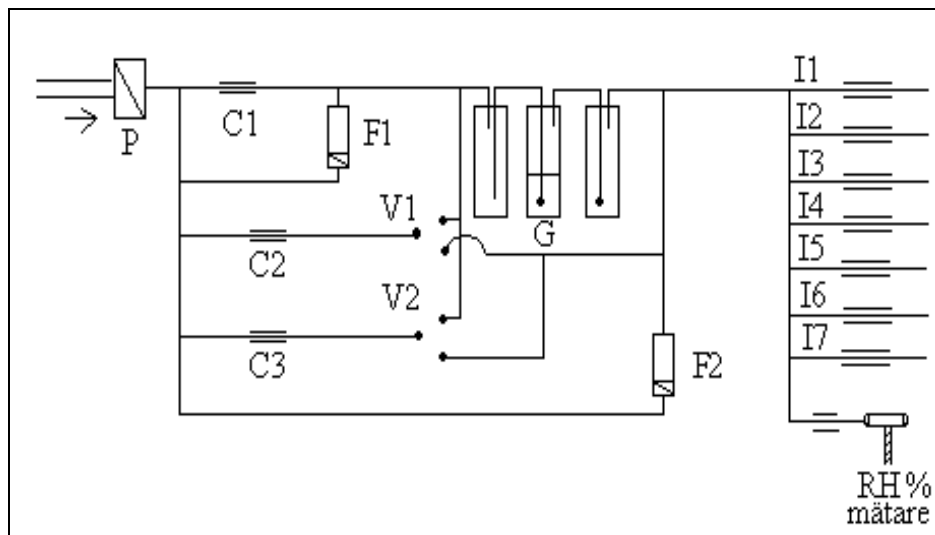
### *Beläggning av XAD-2 med NIT*

10.0 g XAD-2 och 15 ml acetonitril blandades i en rundkolv. 500 mg NIT i 10 ml acetonitril tillsattes. Blandningen evaporerades omedelbart i evaporator vid 35°C (15). Den belagda sorbenten packades i glasrör (4 mm(i.d)) med silaniserad glasull i ändarna. Längden av adsorbent i rören var ung 35 mm. Glasrören pluggades igen i ändarna med teflonplug. Rören förvarades i rumstemperatur i mörker fram till dess att de användes i provtagningen.

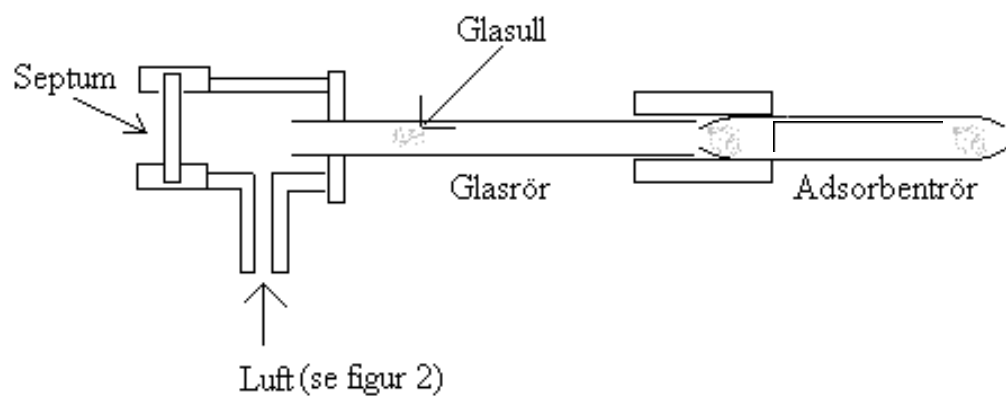
### *Provtagning av morfolin i gasfas*

För att producera luft med kontrollerad luftfuktighet användes en apparatur som leder luften genom gasdispersions-flaskor och mättar luften med vatten och sedan späder ut luften med torr luft (Fig 2). Utrustningen gav en ren atmosfär och möjlighet att variera luftflödet samt den relativa luftfuktigheten. Utrustningen drevs med tryckluft som renades över partikelfilter (0.01µm) samt med aktivt kol. Tryckluften reglerades med tryckregulatorn P. Luftflödet splittrades mellan tre stycken glaskapillär-rör C1 ( 80x0.50 mm i.d.), C2 ( 50x0.61 mm i.d.)och C3 ( 50x0.61 mm i.d.), vilket gav tre flöden. Trevägskranarna V1 och V2 gjorde det möjligt att variera hur stor andel av luften som passerade genom gasdispersionsflaskorna G. De två flödesregulatorerna vid rotametrarna (F1 och F2) användes för att göra små flödesjusteringar. Glaskapillär-rören C1-3 var valda så att luftfuktigheter på 20, 50 och 85% kunde erhållas när trevägskranarna V1 och V2 ställts i önskat läge och mindre justeringar med F1 och F2 gjorts. Genom att göra större justeringar av F1 och F2 kunde relativa luftfuktigheter mellan 10 och 85 % erhållas.

Adsorbentrör eller filter anslöts efter injektionsblocken I1 till I7 (figur 2). Vid försöken injicerades en lösning av morfolin i acetonitril via injektionsblocket (genom septat) på en tuss glasull i det glasrör som anslöts till injektionsblocket (figur 3). Morfolinet förgasades och transporterades med luftflödet till adsorbenten.



Figur 2. Skiss över genereringsutrustningen



Figur 3. Skiss över genereringsutrustningens injektionsblock

### Försöksuppläggning för provtagning av morfolin i gasfas

Vid varje generering kördes 6 spikade prover och en blank. I tabell 1 kan de mängder morfolin som använts vid spikning ses, och vad dessa skulle motsvara vid en luftprovtagning.

Tabell 1 Mängder morfolin som användes för spikning vid generering (NGV= nivågränsvärdet).

Mängd tillsatt $\mu\text{g}$	Motsvarar halt	Motsvarar tid	Motsvarar flöde
2.2	1/10 NGV	15 min	20 ml/min
21.5	1/10 NGV	15 min	200 ml/min
229	NGV	15 min	200 ml/min
342	2*NGV	2H	20 ml/min
345	2*NGV	2H	20 ml/min
1570	NGV	2H	200 ml/min

Provtagningstiden var 30 min eller 2 timmar. Mängderna morfolin som spikades är beräknade utifrån 15 minuters eller två timmars provtagning. För att allt morfolin skulle hinna förgasas och hamna på kemisorbenten, pumpades luft igenom i 30 min under 15 minuters provtagningen. Flödena som användes var 20 ml/min, 50 ml/min och 200 ml/min. På grund av problem med lågt utbyte samt stor spridning på analysresultatet då 20 ml/min testades, ersattes 20 ml/min av 50 ml/min. Mängderna morfolin som användes för spikning är dock beräknade för ett flöde på 20 ml/min. För varje spikningsnivå utfördes en generering med 20% luftfuktighet och en med 85% luftfuktighet. När försöket avslutades proppades ändarna igen, och rören förvarades i rumstemp i mörker fram till analysen. När proverna skulle analyseras överfördes rörens XAD-2 till en glasburk och 3 ml acetonitril tillsattes. Lösningen skakades manuellt i ungefär 5 minuter och analyserades på beskrivet HPLC system.

### HPLC-analys

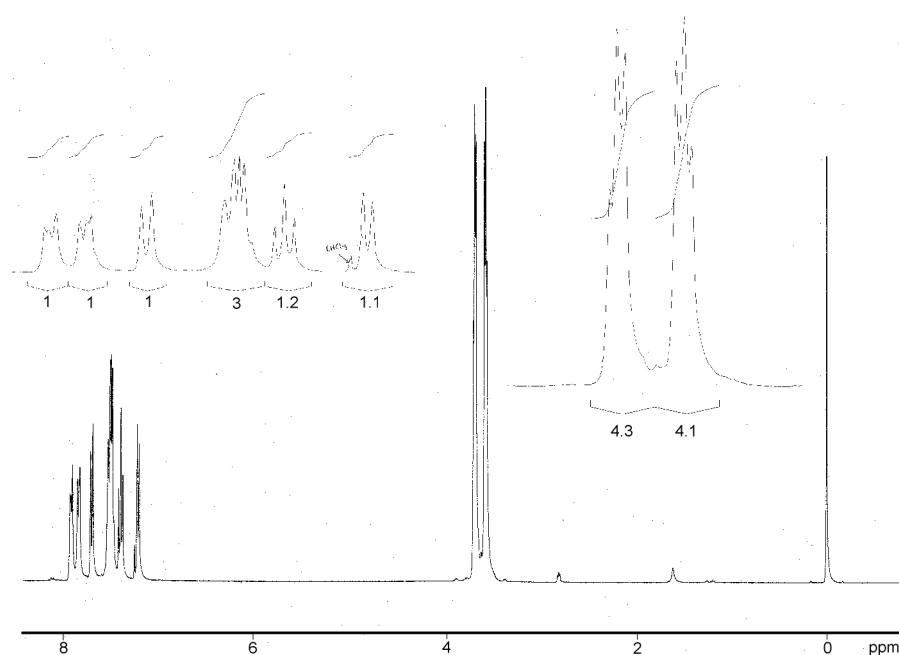
Provbarkarna laddades i Waters (Waters corporation Milford, U.S.A) 712 WISP autoinjektor och 10  $\mu\text{l}$  injicerades in till HPLC systemet. Pumparna var Waters modell 6000 A och 510 HPLC pump. Waters PCM Pump Control Module, Degasser ERC-3415, samt Waters model 440 absorbansdetektor användes. Styrning av pumpar, insamling och berabnetning av data sköttes av Waters Millenium datasystem. Kolonnerna som användes var Waters RADIAL-PAK NVC<sub>18</sub> (100·5 mm i.d., 4  $\mu\text{m}$  partiklar) samt Waters NOVA-PAK C<sub>18</sub> (250·4.6 mm cartridge, 4  $\mu\text{m}$  partiklar). Till Waters NOVA-PAK C<sub>18</sub> användes en förkolonn, Waters C<sub>18</sub>10 mm. Till Waters RADIAL-PAK NVC<sub>18</sub> användes isokratisk eluering, med mobilfasen 40 % milliQ och 60% acetonitril. Retentionstiden för morfolin var under dessa förhållanden 1.8 minuter och NIT eluerade efter ung 14 minuter. Till Waters NOVA-PAK C<sub>18</sub> användes följande gradientprogram. 50:50 acetonitril-milliQ i sex minuter, linjärt upp till 100% acetonitril under två minuter, efter 4 minuter med 100% acetonitril ner till 50:50 igen under två minuter. Totala tiden för varje körning var 25 minuter, för att systemet skulle jämvikta sig på 50:50 innan nästa prov. Under dessa förhållanden var retentionstiden för morfolin 4.9 minuter och  $k'$  var 2.0. Överskott NIT eluerade efter ung 15 minuter. Flödet var 1.0 mL·min<sup>-1</sup> med båda kolonnerna. Tiourea derivatet detekterades vid 254 nm.

### *Bestämning av lagringsstabilitet*

12 prover genererades med en halt motsvarande gränsvärdet. Flödet var 200 ml/min, provtagningstiden 30 minuter och luftfuktigheten var 50%. Efter genereringen proppades glaströren igen med teflonpluggar och rören lindades in i aluminiumfolie. Sex stycken prover (varav 1 blank) lagrades i mörker i rumstemperatur i 17 dagar. De resterande sex proverna lagrades i kylskåp i 17 dagar före analys.

## Resultat och diskussion

Smältpunkten för det omkristalliserade morfolin-NITderivatet var 158-159°C, och molmassan 272.3 g·mol<sup>-1</sup>. Derivatets identitet verifierades med <sup>1</sup>H-NMR, och i figur 4 visas <sup>1</sup>H-NMR-spektrumet.



Figur 4. <sup>1</sup>H-NMR spektrum för morfolin-NIT derivat

Vid 3.6 ppm och 3.7 ppm kommer signalen från de 8 väten som finns på morfolindelen av derivatet. En jämförelse gjordes med ett <sup>1</sup>H-NMR för bara morfolin (Aldrich 25,236-0). Signalen från de fyra vätena som sitter närmast syret kommer vid ungefär 3.7 ppm både i derivatets och morfolinets spektrum. Signalen från de fyra väten som sitter närmast kvävet i morfolin har dock förskjutits mot något lägre pålagt fält jämfört med motsvarande signal i det rena morfolinspektrumet, dvs signalerna ligger närmare varandra i derivatet. NIT påverkar omgivningen för dessa protoner vilket ger en liten förskjutning i skift. Mellan 7-8 ppm kommer signalerna från de 7 väten som sitter på aromatdelen av NIT samt en något bredare topp som kommer från det väte som sitter på kvävet intill aromatringsen. En jämförelse gjordes med ett <sup>1</sup>H-NMR-spektrum för ren NIT (Aldrich N452-5) och det överensstämmer med det förväntade. Den isolerade produkten är följaktligen med största sannolikhet den som bildas enligt reaktionen i figur 1.

Derivatet är lösligt i vattenblandbara lösningsmedel, vilket är en av förutsättningarna för att vätskekromatografi skall vara en passande instrumentmetod att använda.

Detektionsgränsen beräknades utifrån IUPAC:s (International Union of Pure and Applied Chemistry) definition (27) att detektionsgränsen är den lägsta analytkoncentrationen som

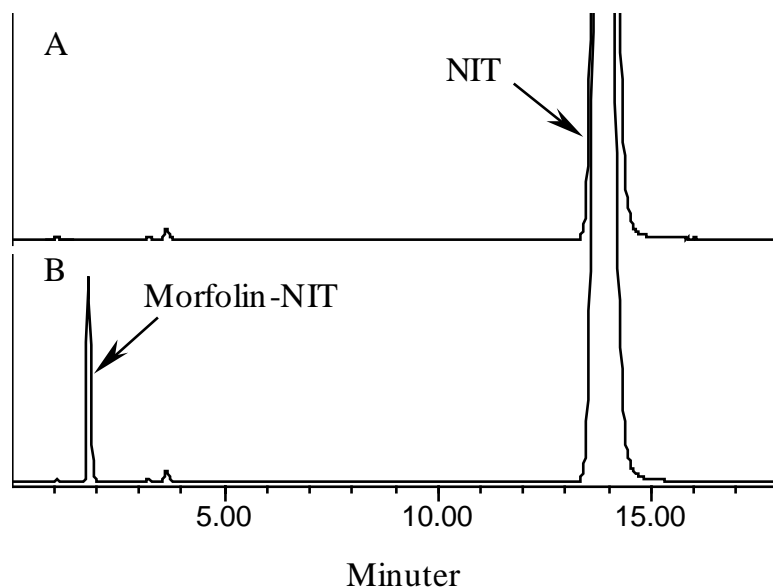
med tillräckligt stor konfidens kan bestämmas vara skild från en analytisk blank. Detektionsgränsen ( $C_L$ ) ges av:

$C_L = k s_B / S$  där  $S$  är metodens känslighet, dvs lutningen på kalibreringskurvan  
 $s_B$  är blankens standardavvikelse  
 $k$  är en konstant

Ett värde på  $k=3$  rekommenderas av IUPAC(27), vilket användes vid beräkningen. Variabiliteten i respons från prov med låg koncentration används för att approximera bruset, detta förutsätter dock att standarddeviationen är konstant samt att responserna är linjära i det koncentrationsintervall som används för bestämningen. Sambandet  $C_L = 3 s_{y/x} / S$  gäller då.

Sex lågnivåstandarder av olika koncentration preparerades, spikade på det medium som använts för prov. Halterna varierade från ett blankprov (med mätbar signal) till högst 10 ggr den förväntade detektionsgränsen. Dessa lågnivå standarder analyserades under samma betingelser som vanliga prov. En regressionsanalys utfördes sedan och detektionsgränsen bestämdes. Vid 254 nm hade tiourea derivatet en detektionsgräns på ungefär 1 ng när en injektionsvolym på 10  $\mu\text{l}$  användes. Kalibreringskurvan var linjär inom området 0.1-400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Ett försök utfördes genom att spika NIT- impregnerade glasfiberfilter. I figur 5 visas ett HPLC-kromatogram för ett spikat filter.



Figur 5. HPLC-kromatogram för morfolin-NIT derivat. A – filterblank. B – Filter spikat med 23  $\mu\text{g}$  morfolin.

De spikade glasfiberfiltrena kvantifierades mot standards gjorda från uppvägda tiourea derivat. Utbytet beräknas enligt:  $\text{Morfolin}_{\text{analyserad}} / \text{Morfolin}_{\text{spikad}}$ . I tabell 2 visas utbytet för de spikade filtrena, vilket ligger runt 100%. Detta visar att reaktionen är tillräckligt snabb mellan morfolin och NIT och att den är kvantitativ vid rumstemperatur

Tabell 2. Utbyte av morfolin som tiourea på NIT-impregnerade glasfiberfilter. Sex prov för varje nivå.  
RSD = relativ standardavvikelse

Mängd tillsatt µg	Utbyte %	RSD %
23	104	4,6
186	103	3,0
356	102	4,3

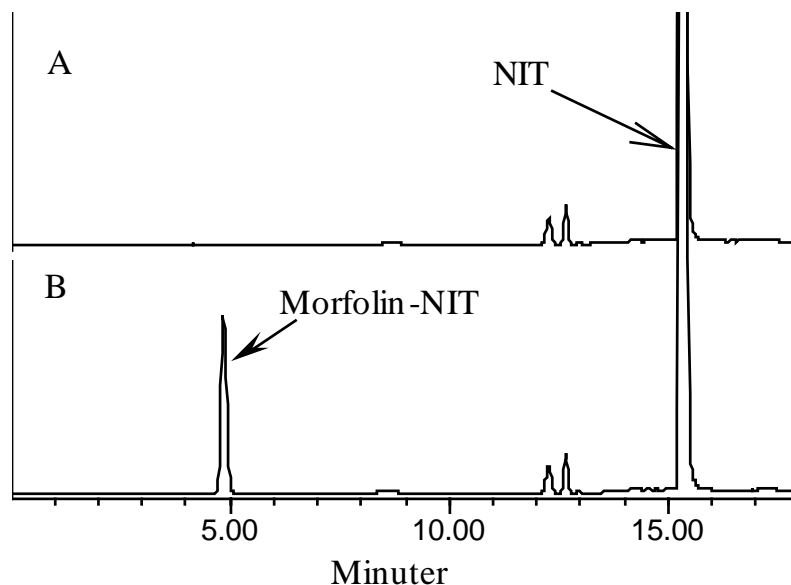
Spikningen med 23 µg morfolin på filtret motsvarar en pumpad provtagning då halten är 1/10 av nivågränsvärdet ( $70 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) i 15 minuter, med ett flöde på 200 ml/min. 355.6 µg på filtret motsvarar provtagning av 2· NGV i 2 timmar, med ett flöde på 20 ml/min..

En jämförelse gjordes mellan uppvägda standards och standards där morfolin spikades till . lösning med överskott av NIT. Spikade standards i tre halter kvantifierades mot en kalibreringskurva gjord från analys av uppvägda standards. Medelvärdet för utbytet för dessa spikade standards blev 103% med en relativ standardavvikelse på 0.9%. Detta visar att de kristaller som användes för tillredning av uppvägda standards var rena samt att reaktionen är kvantitativ i lösning. Renheten på kristallerna styrktes också av att smältpunktsintervallet var litet.

NIT-impregnerade glasfiberfilter användes vid den första pumpade provtagningen av morfolin i gasfas. Att belägga glasfiberfilter med NIT är enklare än att belägga adsorbenter, därför är det en fördel om filter kan användas. Flödet genom provtagarna var 200 ml/min och provtagningstiden 30 minuter. En mängd morfolin motsvarande gränsvärdet genererades och luftfuktigheten var 20%. Utbytet blev bara 6 %, vilket inte var helt oväntat. Vid 20 °C har morfolin ett ångtryck på 7.0 mmHg (28) vilket gör att morfolin förekommer som gas (och inte som aerosol) vid de undersökta halterna. Reagensbelagda glasfiberfilter passar bra för provtagning av aerosoler, men för de flesta gaser fungerar pumpad provtagning med belagda filter inte. Då morfolinet pumpas med så hög hastighet förbi det reagensbelagda filtret, hinner inte reaktionen ske. En kontroll av det glasrör i vilket spikningen skett, visade att mindre än 1% var kvar där, dvs i stort sett allt hade passerat rakt igenom filtret.

Nya genereringar gjordes där XAD-2 belagd med 5% NIT användes. Två olika typer av XAD-2 användes för beläggning. I den första beläggningen användes Servachrom XAD typ 2 analytiskt ren, och i den andra Amberlite XAD-2. När de spikade filtrena analyserades utgjorde inte blanken något problem, men XAD-2 hade föroreningar som störde vilket ledde till blankvärden som fick subtraheras från den kvantifierade mängden. Detta hade ingen större betydelse vid höga halter, varför en del av analyserna på XAD-2 spikade rör kördes utan gradientprogram. Då lägre halter skulle analyseras användes en längre kolonn, och ett gradientprogram. Detta gav något längre analystider, men det blev möjligt att detektera ännu lägre halter. Amberlite XAD-2 tvättades före användning, vilket gjorde att

den hade något färre föroreningar som hade absorbans vid aktuell våglängd jämfört med Servachrom XAD typ 2. I figur 6 visas ett HPLC-kromatogram för ett prov från genereringen.



Figur 6. HPLC-kromatogram för morfolin som 1-naftyltioureaderivat från gasfaspikning på reagensbelagd XAD-2. A – Filterblank. B – Filter spikat med 22 µg morfolin.

Tabell 3. Utbyte av morfolin som tiourea från XAD-2 belagd med NIT vid olika mängder och luftfuktigheter.

Mängd tillsatt µg	XAD-2	HPLC	RH%	Utbyte %	RSD %
2.2	A	N	20	89	4.3
2.2	A	N	85	88	2.1
22	A	N	20	97	1.5
22	A	N	85	100	1.1
229	S	R	20	86	3.9
229	S	R	85	89	3.9
342 <sup>a</sup>	S	R	20	86	4.1
345	A	N	85	94	0.7
1570	S	R	20	94	1.1
1570	S	R	85	90	4.3
Medel				91,3	5,2

A =Amberlite

S= Servachrom

<sup>a</sup> = Fyra prover

R=RADIAL-PAK NVC<sub>18</sub>

N=NOVA-PAK C<sub>18</sub>

Tabell 3 visar medelutbytet för de 6 prover som genererats vid varje försök. Utbytet ligger mellan 86-100 %. Proverna med den största mängden morfolin tillsatt (1570 µg, vilket



motsvarar 1640 µg/ml av derivat vid analys ), ligger utanför kalibreringskurvans linjära område. Detektorn har en linjär respons upp till ungefär 400 µg/ml. Kalibreringskurvan böjer sedan av, men genom att lägga standards tätt vid den förväntade halten kunde en kvantifiering göras. En kortare provtagningsstid, eller ett lägre flöde vid provtagningen är dock att föredra om halterna förväntas vara så höga.

Nivågränsvärdet är beräknat för exponering under en hel arbetsdag, dvs åtta timmar. Det relativt höga nivågränsvärdet för morfolin i luft ( $70 \text{ mg/m}^3$ ) gjorde att det blev opraktiskt att provta i 8 timmar då halterna låg vid och över gränsvärdet. Kalibreringskurvan var inte linjär vid de höga koncentrationerna. Det verkade bero på icke-linjär detektorrespons vid höga koncentrationer, och inte på lösligheten av derivatet som dock kommer att vara begränsande vid koncentrationer över ungefär 3 mg/ml. Ett sätt att kunna provta under åtta timmar vid höga halter är att skaka ut XAD:n i större lösningsmedelsvolym. Hantering av lösningsmedel i större mängder är dock inte att sträva efter, det gör också att det krävs fler steg innan analysen, vilket ger en försämring av metodens snabbhet och enkelhet. Flera två- timmars provtagningar i följd under arbetsdagen får göras för att få ett värde att jämföra mot gränsvärdet. Metoden testades för två timmars provtagning av morfolinhalter som i luft motsvarar 9.5- 143.1  $\text{mg/m}^3$ . Den testades också för 15 minuters provtagning av morfolinhalter mellan 7.3-76  $\text{mg/m}^3$ . 15 minuters provtagningen kan jämföras mot kortidsvärdet som är 110  $\text{mg/m}^3$ . De undersökningar av morfolinhalter i luft som gjorts hittills på arbetsplatser har överlag visat på halter långt under gränsvärdet, varför det är bra att metoden även klarar att detektera låga halter. Genom att variera provtagningsstid och flöde kan ett brett haltområde täckas in. Då provvolymen är 2.4 liter (20 ml/min, 2H) kan morfolinhalter mellan 0.05 -160  $\text{mg/m}^3$  detekteras., beräknat utifrån den erhållna detektionsgränsen och kalibreringskurvans linjäritetsområde. Med en provvolym på 24 liter (200 ml/min, 2H) kan morfolinhalter mellan 0.005 -16  $\text{mg/m}^3$  detekteras. Med åtta timmars provtagning (200 ml/min) skulle halter från 0.001  $\text{mg/m}^3$  kunna detekteras.

En statistisk analys (multipel regression) utfördes med hjälp av statistikprogrammet NCSS. Analysen gjordes på medelvärdet av de 6 proverna. Parametrarna mängd tillsatt morfolin, provtagningsstid, samt luftfuktighet skalades i intervallet -1 till +1. Skärningen på regressionskurvan ger medelutbytet och parameterestimatet ger parametrarnas påverkan på utbytet. För att påverkan skall vara signifikant, måste parameterestimatet vara större än standardfelet (29). Resultatet av denna multipla regression ses i tabell 4.

*Tabell 4. Multipel regressionsanalys av haltens, provtagningsstidens samt luftfuktighetens påverkan på utbytet*

Variabel	Parameter- estimat(%)	Standardfel
Utbyte (skärningen)	91.3	2.2
Mängd tillsatt	0.43	3.5
Provtagningsstid	-0.49	2.7
Luftfuktighet	0.89	1.8

Med tanke på den höga luftfuktigheten i många industriella arbetsmiljöer kan stora mängder vatten samlas i provtagaren. En eventuell hydrolys reaktion skulle kunna bilda produkter som skulle störa analysen. Effekten av luftfuktigheten på utbytet är därför viktig

att kontrollera. Ingen av parametrarna tillsatt mängd, provtagningstid eller luftfuktighet visade sig ha någon signifikant (på 5%-nivån) påverkan på medelutbytet. Tabell 3 visar också att hög luftfuktighet inte är någon nackdel, utbytena för både 20% och 85% relativ luftfuktighet är generellt höga.

För att kontrollera om de två olika XAD-typerna som använts var likvärdiga eller om de gav utbyten vars medel skiljde sig signifikant, utfördes ett signifikanstest bestående av F-test och tvåsidigt T-test (30). Det visade sig att de två XAD-typerna gav medelvärden på utbytet som var signifikant skilda från varandra. Servachrom XAD gav ett medelutbyte på 89% med en RSD på 4.5% (n=28), och Amberlite XAD gav ett medelutbyte på 94% med RSD på 5.3% (n=30). Då målet med användandet av olika adsorbenter inte var att se om någon skillnad förelåg mellan dem hade inte någon experimentell design lagts upp i förväg för att se om de två XAD-typerna skulle skilja sig från varandra. För att med säkerhet kunna avgöra om adsorbenterna har olika effektivitet bör en separat undersökning göras för detta. Amberlite XAD-2 har tidigare använts för provtagning av andra aminer (2,16) och eftersom den gav ett något högre utbyte rekommenderas att Amberlite XAD-2 används vid provtagning av morfolin. Det totala medelutbytet för genereringen blev 91.3% (RSD= 5.2%, n=58).

En orsak till att använda reagensbelagda adsorbenter är att bilda ett derivat då analyten reagerar med reagenset som förhoppningsvis är stabilt. Naftylisotiocyanat- amin derivat har tidigare visat sig vara stabila (28), och i tabell 5 visas resultatet av lagringstestet för morfolin.

Tabell 5. Resultat av prover lagrade i 17 dagar

Lagring	Mängd tillsatt ug	RH%	Utbyte %	RSD %	Antal prov
Rumstemp	221	50	88	2.5	5
Kylskåp	221	50	91	2.3	6

Ett statistiskt signifikanstest visade att medelutbytet inte skiljer sig signifikant mot det medelutbyte som erhöles från prover som analyserats samma dag. Derivatet är alltså stabilt efter lagring i +20 i två veckor, vilket innebär att prover inte behöver analyseras direkt efter provtagning. När XAD:n skakats ut i lösningsmedel rekommenderas analys samma dag, då risk för nedbrytning av derivatet eventuellt kan finnas.

Försöksuppläggningsen har huvudsakligen följt den europeiska standarden EN 1076 (31), som beskriver testmetoder och specifika krav på adsorbenttrör. I standarden EN 482 (32) beräknas en provtagningsmetods totala osäkerhet (Overall Uncertainty) enligt:

$$\frac{\left| \bar{x} - x_{ref} \right| + 2s}{x_{ref}} \times 100$$

Där  $\bar{x}$  är medelvärdet av resultatet på ett n antal upprepade mätningar  
 $x_{ref}$  är det sanna eller accepterade referensvärdet av koncentrationen  
 $s$  är standardavvikelsen av mätningarna

Den totala osäkerheten för hela metoden beräknades och den blev 18.5 %. Vid provtagning för jämförelse med gränsvärdet bör den totala osäkerheten vara  $\leq 50\%$  för halter mellan 0.1-0.5 NGV och  $\leq 30\%$  för halter 0.5-2 NGV(32).

Sorbentbaserade diffusionsprovtagare har blivit en alltmer använd provtagningsmetod för provtagning av lättflyktiga ämnen. Användandet av reagensimpregnerade sorbenter för provtagning av gasformiga aminer har öppnat vägen för diffusionsprovtagning också av dessa ämnen. Den stora fördelen med diffusionsprovtagning är enkelheten, provtagningen kräver inga pumpar och man slipper därmed problemen med pumpkalibrering och krånglande provtagningsutrustning. En diffusionsprovtagare för provtagning av reaktiva ämnen, där adsorbenten är ett reagensbelagt filter, har delvis utvecklats av Arbetslivsinstitutet (14). För diffusionsprovtagning av flyktiga primära och sekundära aminer har denna provtagare använts tillsammans med ett naftylisotiocyanatimpregnerat filter. Provtagaren har validerats för provtagning bland annat av dimetylamin, dietylamin, n-butylamin, och isopropylamin (2,15,16,17).

Användandet av naftylisotiocyanatimpregnerade filter för diffusionsprovtagning av morfolin har inte testats än, men alla förutsättningar finns för att det skulle vara en bra metod. Det har visat sig tidigare att provtagaren fungerar väl vid extremt låga vindhastigheter. Detta gör att provtagaren kan användas både för stationär och personburen provtagning(15). Den kromatografiska bestämningen av tioureaderivatet är väldigt specifik och känslig, vilket gör att provtagaren förmodligen skulle kunna användas för korttids(15 minuter) men även för åtta timmars diffusionsprovtagning av morfolin

## Referenser

1. Simon P., Lemacon, C. 1987. Determination of Aliphatic Primary and Secondary Amines and polyamines in Air by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 59:480-484.
2. Andersson, K., Hallgren, C., Levin, J-O., Nilsson, C-A. 1985. Determination of Ethylenediamine in Air Using Reagent-Coated Adsorbent Tubes and High-Performance Liquid Chromatography on the 1-Naphthylisothiourea Derivative. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 46(4):225-229.
3. Levin, J.-O. ed. 1990. Principer och metoder för provtagning och analys av ämnen upptagna på listan över hygieniska gränsvärden. *Arbete och hälsa.* 40.
4. NIOSH. 1977. Manual of Analytical Methods. National Institute of Occupational Safety and Health, Cincinnati, Ohio.
5. NIOSH. 1977. Manual of analytical methods. US Department of Health, Education and Welfare, Cincinnati, OHIO. Method S 150.
6. Bianchi, A., Muccioli, G. 1980. Gas chromatic determination of morpholine together with isopropyl alcohol, toluene, and xylenes in industrial atmospheres. *Anal. Abstr.* 38:3H 25.
7. Andersson, K., Hallgren, C., Levin, J-O., Nilsson, C-A. 1984. Determination of aliphatic amines in air by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 1-naphthyl isocyanate derivatives. *Journal of Chromatography.* 312:482-488.
8. Dalene, M., Mathiasson, J., Jönsson, Å. 1981. *J.Chromatogr.* 207:37.
9. Kuwata, K., Yamazaki, Y. Uebori, M. 1980. Determination of Traces of Low Aliphatic Amines by Gas Chromatography. *Anal.Chem.* 52:1980-1982.
10. Skarping, G., Renman, L. 1983. *J.Chromatogr.* 267:315.
11. Wellons, S. L., Carey, M.A. 1978. High-Performance Liquid Chromatographic Separation And Quantitation of Polyfunctional Amines as their m-toluoyl derivatives. *Journal of Chromatography.* 154:219-225.
12. Morley, J., Elrod, L, Linton, C, Shaffer, D, Krogh, S. 1997. Determination of residual amines used in bulk drug synthesis by pre-column derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 766:77-83.
13. Imai, K, Toyo'oka ,T, Miyano, H. 1984. Fluorogenic Reagents for Primary and Secondary Amines and Thiols in High-performance Liquid Chromatography. *Analyst.* 109:1365-1373.

14. Elskamp, C. J, Schultz, G. R. 1986. A Solid Sorbent Air Sampling and Analytical Procedure for Methyl-, Dimethyl-, Ethyl-, and Diethylamine. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 47(1):41-49.
15. Björkqvist, B. 1981. Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of chromatography.* 204:109-114.
16. Levin, J.-O., Lindahl, R, Andersson, K. 1990. Utvärdering av en diffusionsprovtagare för primära och sekundära aminer. *Undersökningsrapport.* 18.
17. Levin, J.-O., Lindahl, R., Andersson, K., Hallgren, C. 1989. High performance liquid-chromatographic determination of diethylamine in air using diffusive sampling and thiourea formation. *Chemosphere.* 18:2121-2129.
18. Levin, J.-O., Andersson, K., Fängmark, I., Hallgren, C. 1989. Determination of Gaseous and Particulate Polyamines in Air Using Sorbent or Filter Coated with Naphthylisothiocyanate. *Appl. Ind. Hyg.* 4:98-100.
19. Levin, J.-O., Andersson, K, Hallgren, C. 1989. Determination of monoethanolamine and diethanolamine in air. *Ann Occup Hyg.* 33:175-180.
20. Lundberg, P., (Ed). 1996. Vetenskapligt Underlag för Hygieniska Gränsvärden, Morfolin. *Arbete och hälsa.* 25.
21. Cosmetic Ingredient Review panel 1989. Final report on the safety assessment of morpholine. *J Am Coll Toxicol.* 8:707-748.
22. Bellander, T., Hagmar L. 1982. Kriteriedokumentet för hygieniska gränsvärden, morfolin. *Arbete och hälsa.* 32:1-32.
23. Mirvish, S. S. 1975. Formation of N-Nitroso Compounds: Chemistry, Kinetics, and *in vivo* Occurrence. *Toxicol. and Appl. Pharm.* 31:325-351.
24. Andersson, K., Levin, J-O., Lindahl, R., Nilsson, C-A. 1984. Influence of air humidity on sampling efficiency of some solid adsorbents used for sampling organics from work-room air. *Chemosphere.* 13, No. 3.:437-444.
25. Suter, C. M., Moffett ,E.W. 1933. Alpha- Naphthyl Isothiocyanate as a Reagent for Primary and Secondary Aliphatic Amines. *J. Am.Chem. Soc.* 55:2497.
26. Lindahl, R., Levin, J-O., Andersson, K. 1993. Determination of volatile amines in air by diffusive sampling, thiourea formation and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 643:35-41.
27. Thompson, M., Bee, H.M. Et .al. 1987. Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit. *Analyst.* 112:199-204.
28. Mjos, K. 1978-1984. Cyclic amines. *I Encyclopedia of chemical technology.*

29. Carlsson, R. 1992. Design and optimization in organic synthesis, Data handling in science and technology. Vol 8.
30. Miller, J. C., Miller, J.N. 1993. Statistics for Analytical Chemistry. Ellis Horwood and Prentice Hall, West Sussex.
31. Levin, J.-O. 1994. prEN 1076, Workplace atmospheres-Pumped sorbent tubes for the determination of gases and vapours-Requirements and test methods. / Europeiskt standardiseringsarbete inom området kemiska ämnen i arbetsplatsluft, Umeå.
32. Levin, J.-O. 1994. EN 482, Workplace atmospheres-General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents. / Europeiskt standardiseringsarbete inom området kemiska ämnen i arbetsplatsluft, Umeå.