

# VALIDATION OF METHOD FOR IDENTIFYING AROMATIC AMINES FROM DYED LEATHER

## VALIDAREA METODEI DE IDENTIFICARE A AMINELOR AROMATICE DIN PIEILE VOPSITE

Ciprian CHELARU\*, Gabriela MACOVESCU, Marian CRUDU, Dana GURĂU

INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, Bucharest, Romania, icpi@icpi.ro

### VALIDATION OF METHOD FOR IDENTIFYING AROMATIC AMINES FROM DYED LEATHER

**ABSTRACT.** The use of chemicals to obtain semi-processed leather must be consistent with the environmental laws and regulations, which requires evaluation of toxicity in leather goods intended for consumption. The paper proposes to implement and validate an instrumental analytical method to determine azo dyes in leather. The presence of azo dyes was determined on a total of three restricted aromatic amines (4-aminobiphenyl, benzidine, 5-nitro-o-toluidine), which can be found as a result of the split of dyes used in leather dyeing. Validation parameters of gas chromatographic method were: accuracy (trueness and reliability), precision, sensitivity, limit of detection, limit of quantification, working range, linearity.

**KEY WORDS:** method validation, azo dyes, leather, benzidine, 4-aminobiphenyl, 5-nitro-o-toluidine

### VALIDAREA METODEI DE IDENTIFICARE A AMINELOR AROMATICE DIN PIEILE VOPSITE

**REZUMAT.** Utilizarea substanțelor chimice la obținerea semifabricatelor din piele trebuie să fie în concordanță cu legislația și normele de protecție a mediului ceea ce impune evaluarea toxicității produselor din piele destinate consumului. Lucrarea își propune implementarea unei metode analitice instrumentale pentru determinarea coloranților azoici din piele și validarea acesteia. Controlul prezenței coloranților azoici s-a efectuat pe un numar de trei amine aromatice interzise (4-aminobifenil, benzidină, 5-nitro-o-toluidină) ce pot fi regăsite ca urmare a scindării coloranților utilizati la vopsirea pieilor. Parametrii de validare ai metodei gaz-chromatografice au fost exactitatea (justețea și fidelitatea), precizia, sensibilitatea, limita de detecție, limita de quantificare, domeniul de lucru, liniaritate.

**CUVINTE CHEIE:** validare metodă, coloranți azoici, piele, benzidină, 4-aminobifenil, 5-nitro-o-toluidină

### LA VALIDATION D'UNE MÉTHODE POUR IDENTIFIER LES AMINES AROMATIQUES DANS LE CUIR TEINT

**RÉSUMÉ.** L'utilisation de produits chimiques pour obtenir le cuir semi-fini doit être conforme aux lois et règlements pour l'environnement, qui nécessite l'évaluation de la toxicité des produits en cuir pour la consommation. L'article propose la mise en œuvre et la validation d'une méthode d'analyse instrumentale pour la détermination des colorants azoïques dans le cuir. La présence de colorants azoïques a été vérifiée sur un total de trois amines aromatiques interdites (l'amino-4-biphényle, la benzidine, la 5-nitro-o-toluidine), qui peuvent être trouvées à la suite de la division des colorants utilisés dans la teinture du cuir. Les paramètres de validation de la méthode de chromatographie en phase gazeuse ont été : l'exactitude (justesse et fidélité), la précision, la sensibilité, la limite de détection, la limite de quantification, la plage de travail, la linéarité.

**MOTS-CLÉS :** validation de la méthode, colorants azoïques, cuir, benzidine, amino-4-biphényle, 5-nitro-o-toluidine

## INTRODUCTION

The leather industry is facing increasingly stricter and complex legal constraints and issues related to environmental protection.

The new concept of innocuousness: "the quality of not being harmful" increasingly gains interest from the consumer, who wants to make sure that the product is free of chemicals (synthetic or natural) that might be hazardous for health.

The most toxic products, mutagens, carcinogens (Eurachem Guide, 1998) were the first to have alarmed European Union and imposed publication of several directives that prohibit or limit the use of these chemicals (Directive 99/51/EC on pentachlorophenol, Directive 2002/61/EC banning azo dyes, Directive 2009/563/EC on eco-labelling footwear, Directive 2010/75/EU on industrial emissions in tanneries, REACH).

Regulation (CE) no. 552/2009 of 22 June 2009 amended Regulation (CE) No. 1907/2006 of the

## INTRODUCERE

Industria de pielărie se confruntă cu probleme de protecție a mediului și constrângeri legislative tot mai stricte și mai complexe.

Noul concept de inocuitate: „calitatea de a nu fi dăunător” câștigă tot mai mult interes din partea consumatorului, acesta dorind să se asigure că produsul nu conține substanțe chimice (sintetice sau naturale) care ar putea avea un efect dăunător asupra sănătății.

Cele mai toxice produse, agenții mutageni, cancerogeni, au fost primele care au alarmat Uniunea Europeană și au impus publicarea mai multor directive care interzic sau limitează utilizarea acestor substanțe chimice (Directiva 99/51/CE privind pentaclorfenolul, Directiva 2002/61/CE privind interzicerea coloranților azoici, Directiva 2009/563/CE privind eticheta ecologică a încăltămintei, Directiva 2010/75/EU privind emisiile industriale în tăbăcării și REACH).

Regulamentul (CE) NR.552/2009 al Comisiei din 22 iunie 2009 a modificat Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) fiind

\* Correspondence to: Ciprian CHELARU, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, Bucharest, Romania, icpi@icpi.ro

European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), compulsory for all 27 EU countries. Commission Decision 2009/563/CE from 9 July 2009 establishing the ecological criteria for the grant of Community Eco-label for footwear made a uniform regulation possible in the EU.

The leather manufacturer becomes increasingly aware of the importance of environmental protection, which he is both dependent on and responsible for [1-12]. Attention to hazardous chemicals falls within the concept of sustainable development, environmental protection is reconsidered, toxicity of products for consumers is examined [13-15].

Azo dyes decompose to form aromatic amines, benzidine derivatives, under reductive conditions. EU Regulation 552/2009 prohibits a number of 22 aromatic amines, to which two more were added since 2015. These 24 amines are known or potential carcinogens. EU Regulation provides the test method for each type of substrate and defines the detection limit of 30 mg/kg for each amine that may be found in leather.

Products that may contain azo dyes are garments, footwear, textiles or leather, toys and toys which include textile or leather, bedding, towels, hairpieces, wigs, hats, nappies and other sanitary items, sleeping bags, gloves, handbags, purses/wallets, yarn and fabrics intended for use by the final consumer.

Among the prohibited aromatic amines are the following:

### Benzidine

Along with other aromatic amines (e.g. 2-naphthylamine), benzidine – Figure 1 – was withdrawn from industry service due to its high carcinogenic potential.

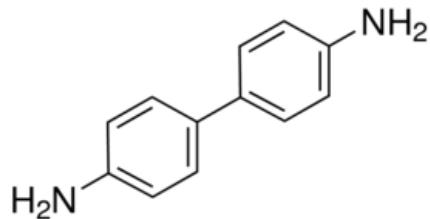


Figure 1. Benzidine structure [4]  
Figura 1. Structura benzidinei [4]

Benzidine production was declared illegal in the United Kingdom in 2002, and its control was taken over by COSHH (Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002) [16].

Since 2002, the EU prohibited the use of azo dyes containing at least one azo link, which may lead, by reduction, to compounds of aromatic amines class whose concentration exceeds 30 ppm and are potentially carcinogenic, mutagenic or teratogenic.

obligatoriu pentru toate cele 27 de țări ale UE. Decizia Comisiei 2009/563/CE din 9 iulie 2009 de stabilire a criteriilor ecologice de acordare a etichetei ecologice comunitare pentru încălțăminte a făcut ca în UE să existe o reglementare unitară.

Producătorul de piei devine tot mai conștient de importanța protecției mediului înconjurător, de care este, în același timp, dependent și responsabil [1-12]. Atenția acordată substanțelor chimice periculoase se încadrează în conceptul de dezvoltare durabilă, se reconsideră protecția mediului, se evaluează toxicitatea produselor pentru consumatori [13-15].

Coloranții azoici se descompun în condiții reductive cu formarea aminelor aromatice, derivate din benzidină. Regulamentul 552/2009 al UE interzice un număr de 22 de amine aromatice, iar din 2015 fiind adăugate încă 2. Aceste 24 de amine sunt cunoscute a fi agenți cancerigeni sau potențial cancerigeni. Regulamentul UE prevede metoda de testare pentru fiecare tip de substrat și definește limita de detecție de 30 mg/kg pentru fiecare amină posibil a fi găsită în piele, fiind și limita admisă.

Produsele ce pot conține coloranți azoici pot fi articole de îmbrăcăminte, încălțăminte, produse textile sau piele, jucării și jucării care includ textile sau piele, lenjerie de pat, prosoape, meșe, peruci, pălării, scutece și alte obiecte sanitare, saci de dormit, mănuși, genți, poșete/portofele, fire și țesături destinate utilizării de către consumatorul final.

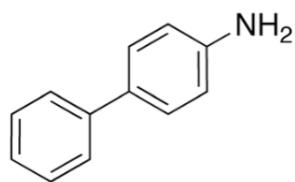
Printre aminele aromatice interzise în utilizare sunt:

### Benzidina

Împreună cu alte amine aromatice (de ex: 2-naftilamina), benzidina – Figura 1 – a fost retrasă din utilizare în industrie datorită potențialului cancerigen ridicat.

### Benzidine

Producerea benzidinei a fost declarată ilegală în Marea Britanie în anul 2002, iar controlul acesteia a fost preluat de către COSHH (Control of Substances Hazardous to Health Regulations, 2002) [16]. Încă din anul 2002 UE interzice utilizarea coloranților azoici ce conțin cel puțin o legătură azo, care, prin reducere, pot conduce la compuși din clasa aminelor aromatice a căror concentrație depășește 30 ppm și au potențial cancerigen, mutagen sau teratogen.

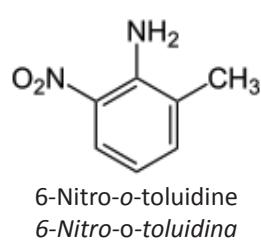
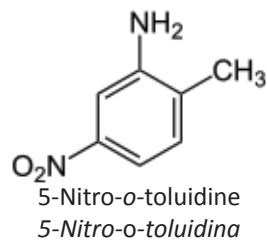
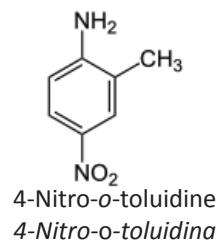
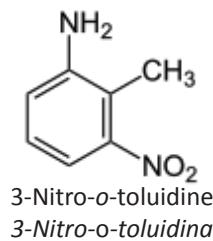
**4-aminobiphenyl**

*Figure 2. 4-aminobiphenyl structure [2]*  
*Figura 2. Structura aminei 4-aminobifenil [2]*

Amine 4-aminobiphenyl – Figure 2 – is an aromatic compound that influences the degradation of the main genetic material – DNA. Laboratory analyses confirmed the growth of skin cancer in the presence of amine 4-aminobiphenyl [17].

**5-nitro-o-toluidine**

5-nitro-o-toluidine is part of nitro-toluidines class, whose chemical structure is shown in Figure 3.



*Figure 3. Nitro-toluidine structure*  
*Figura 3. Structura nitro-toluidinelor*

5-nitro-o-toluidine is a compound included in the composition of the pigments used in dyeing the leather industry. Latest studies on products dyed with such pigments identified adverse health effects caused by the presence of 5-nitro-o-toluidine that causes eye irritation, interference with oxygen transport by blood. High amine concentrations can lead to breathing problems, dizziness and even death.

The substance has carcinogenic potential; studies on rats show that it favors liver cancer development.

Given the importance of the presence of these amines in leather products, the paper aims at implementing an instrumental analytical method for the determination of aromatic amines in the finished leather.

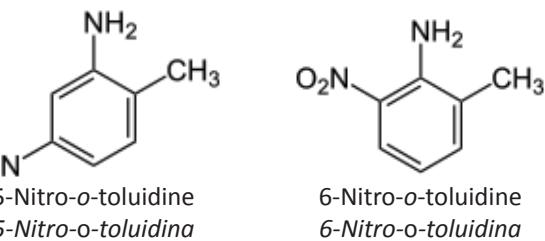
In order to characterize/confirm the content of aromatic amines derived from azo dyes present in dyed leather, gas chromatography method was used and validated with the most accurate and reproducible results regarding the compounds analyzed, consistent with the environmental requirements of leather products.

**4-aminobifenil**

Amina 4-aminobifenil – Figura 2 – este un compus aromatic ce influențează degradarea materialului genetic de bază – ADN-ul. Analizele de laborator au confirmat apariția cancerului de piele în prezența aminei 4-aminobifenil [17].

**5-nitro-o-toluidina**

5-nitro-o-toluidina face parte din grupul nitro-toluidinelor, a căror structură chimică este prezentată în Figura 3.



*Figure 3. Nitro-toluidine structure*  
*Figura 3. Structura nitro-toluidinelor*

5-nitro-o-toluidina este un compus ce intră în compoziția pigmentelor utilizati la vopsirea produselor din industria de pielărie. Ultimale studii efectuate pe produse vopsite cu astfel de pigmenti au identificat efecte negative asupra sănătății cauzate de prezența 5-nitro-o-toluidinei prin producerea de iritații la nivelul ochilor, interferență asupra transportului oxigenului de către sânge. Concentrații mari ale aminei pot duce la probleme de respirație, stări de amețeală și chiar moarte.

Substanța are potențial cancerigen, studiile efectuate pe şobolani demonstrează faptul că este favorizată apariția cancerului la ficat.

Având în vedere importanța prezenței în produsele din piele a acestor amine, lucrarea își propune implementarea unei metode analitice instrumentale pentru determinarea aminelor aromatică în pielea finită.

În vederea caracterizării/confirmării conținutului de amine aromatică derivate din colorații azoici prezente în piele vopsite, s-a utilizat metoda gaz-cromatografică și s-a validat cu rezultate cât mai corecte în ceea ce privește compușii analizați, reproductibile, în concordanță cu cerințele ecologice ale produselor din piele.

## MATERIALS AND METHOD

### Materials

Bovine leather dyed in the laboratory using azo dyes were analysed, prepared according to standard EN ISO 17234-1:2015.

Reagents:

- methanol;
  - t-butyl methyl ether;
  - sodium dithionite, minimum purity 87%;
  - aqueous solution of sodium dithionite, 200 mg/ml, prepared daily;
  - n-hexane;
  - amines
  - methanolic sodium hydroxide 20% (m/v), 20 g of NaOH dissolved in 100 ml of methanol;
  - distilled water – grade 3 according to SR EN ISO 3696:2002 - Water used for analytical laboratories.
- Specifications and methods of analysis.
- standard solution for amine process control: 30 µg amine/ml methanol freshly prepared from the standard solution.

### Equipment

- Gas chromatograph coupled with mass spectrometer (DSQ II - Focus GC) - Thermo Scientific - used for separation and identification of aromatic compounds.
  - Capillary column: TR 5MS: 5% phenyl – 95% dimethylpolixiloxane, length: 60 m, diameter: 0.32 mm, film thickness: 0.25 µm
  - Flame ionization detector
  - Split/split less injector
- Ultrasonic bath with thermostat - Elmasonic S 15 H - used for processing the analyzed samples
- Rotary evaporator LABOROTA eco 4000 - Heidolph - used for concentration of aromatic amine solutions to be analyzed by GC-MS;

### Method

The standard used is EN ISO 17234-1:2015: Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers - Part 1 - Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants. Parameters included in the methodology for the validation of chromatographic method are:

- exactness (trueness and precision);
- accuracy;
- sensitivity;
- detection limit;
- quantification limit;
- scope of work;
- linearity.

## MATERIALE ŞI METODE

### Materiale

S-au analizat piei bovine vopsite în laborator cu coloranți azoici, ce au fost pregătite conform standardului SR EN ISO 17234-1:2015.

Reactivi:

- metanol;
- t-butil metil eter;
- ditionit de sodiu, puritate minimă 87%;
- soluție apoasă de ditionit de sodiu, 200 mg/ml;
- n-hexan;
- amine (4-aminobifenil, benzidină, 5-nitro-o-toluidină)
- hidroxid de sodiu metanolic 20% (m/v), 20 g NaOH dizolvat în 100 ml metanol;
- apă distilată – grad 3 conform SR EN ISO 3696:2002.
- soluție standard pentru controlul procesului aminei: 30 µg amină/ml metanol preparată proaspăt din soluția standard.

### Aparatura

- Gaz cromatograf cuplat cu spectrometru de masă (DSQ II – Focus GC) – Thermo Scientific – utilizare pentru separarea și identificarea compușilor aromatici
  - coloana capilară: TR 5MS: 5% fenil – 95% dimetilpolixiloxan, lungime: 60 m, diametru interior: 0,32 mm, grosimea filmului: 0,25 µm
  - detector cu ionizare în flacără
  - injector Split/Split less
- Baie cu ultrasunete prevăzută cu termostat – Elmasonic S 15 H – utilizată pentru prelucrarea intermediară a probelor analizate
- Rotavapor LABOROTA 4000 eco – Heidolph – utilizat la concentrarea soluțiilor aminelor aromaticice ce urmează a fi analizate prin tehnica GC-MS;

### Descrierea metodei

Standardul ce a stat la baza metodei analitice este „SR EN ISO 17234-1:2015 – Piele. Analize chimice pentru determinarea unumitor coloranți azoici din piele vopsite – Partea 1 – Determinarea unumitor amine aromatice derive din colorații azoici”, parametrii inclusi în metodologia de validare a metodei cromatografice fiind:

- Exactitatea (justețea și fidelitatea);
- Precizia;
- Sensibilitatea;
- Limita de detecție;
- Limita de cantificare;
- Domeniul de lucru;
- Liniaritatea.

**EXPERIMENTAL**

The studies were performed on laboratory bovine hides which have been dyed with known concentrations of amine (4-aminobiphenyl, benzidine, 5-nitro-o-toluidine). A total of 10 specimens were made of each individual leather sample treated with one of three amines. For each specimen, the steps described in SR EN ISO 17234-1: 2015 - "Skin. Chemical analysis for the determination of certain azo colorants in dyed leathers - Part 1 - Determination of certain aromatic amines derived from azo colorations" were followed, namely:

- reductive cleavage with sodium dithionite solution for 30 minutes at  $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- liquid-liquid extraction with t-butyl methyl ether to the column of Kieselgel;
- concentration of the extract obtained in a vacuum rotary evaporator at  $50^{\circ}\text{C}$ ;
- taking the residue with methanol;
- injecting the solution into GC-MS.

**4-aminobiphenyl Determination and Method****Validation****PARTEA EXPERIMENTALĂ**

Studiile au fost efectuate pe piei bovine vopsite ce au fost obținute experimental în laborator, cu concentrații cunoscute ale aminelor luate în studiu (4-aminobifenil, benzidină, 5-nitro-o-toluidină). S-a realizat un număr de 10 epruvete din fiecare eșantion de piele tratată individual cu câte una dintre cele trei amine. Pentru fiecare epruvetă s-au urmat pașii descriși în standartul SR EN ISO 17234-1:2015 – „Piele. Analize chimice pentru determinarea anumitor coloranți azoici din piele vopsite – Partea 1 – Determinarea anumitor amine aromatice derivate din colorații azoici” respectiv:

- Scindare reductivă cu soluție de ditionit de sodiu timp de 30 min la temperatura de  $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- Extractie lichid-lichid cu t-butil metil eter cu trecere prin coloana de Kieselgur;
- Concentrarea extractului obținut într-un rotavapor cu vid la temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ ;
- Preluarea reziduului cu metanol;
- Injectarea soluției în GC-MS.

**Determinarea 4-aminobifenilului și validarea metodei**

Table 1: Initial data of 4-aminobiphenyl

Tabelul 1: Date inițiale 4-aminobifenil

Concentration <i>Concentrație</i>	50 µg/ml
Compound <i>Compus</i>	4-aminobiphenyl <i>4-aminobifenil</i>
Number of analyses <i>Număr de analize</i>	10

Table 2: Results obtained from 4-aminobiphenyl analysis

Tabelul 2: Rezultate obținute din analiza 4-aminobifenilului

$Y_i$ Integrated mass units <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) <i>(det., în µg/ml)</i>	$Y_i$ Integrated mass units <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) <i>(det., în µg /ml)</i>
135771170	56.93	118236753	51.85
126862003	54.35	119284318	52.15
138820772	57.81	120794081	52.59
122394756	53.05	114240328	50.69
121889868	52.90	116439710	51.32

Table 3: Interpretation of results  
Tabelul 3: Interpretarea rezultatelor

Accuracy <i>Exactitatea</i>	Range <i>Domeniu</i>	Value <i>Valoare</i>
$\text{Accuracy / Exactitate \%} = \frac{X_{\text{mediu}}}{\mu} \times 100$	90-110%	106.73
$\text{Bias \%} = \frac{X_{\text{mediu}} - \mu}{\mu} \times 100$	-	6.73 %
Reliability <i>Fidelitatea</i>	Range <i>Domeniu</i>	Value <i>Valoare</i>
$\text{CV (RSD) \%} = \frac{s}{X_{\text{mediu}}} \times 100$	2-20%	4.39%
Repeatability <i>Repetabilitatea</i>		
$r = 2.8 \times s_r$		6.57 $\mu\text{g/ml}$

Table 4: Sensitivity  
Tabelul 4: Sensibilitatea

$Y_i$ Integrated mass units $Y_i$ unități de masă integrate	$X_i$ (det., in $\mu\text{g/ml}$ ) $X_i$ (det., în $\mu\text{g/ml}$ )
28744397	25
107173802	50
285953275	100

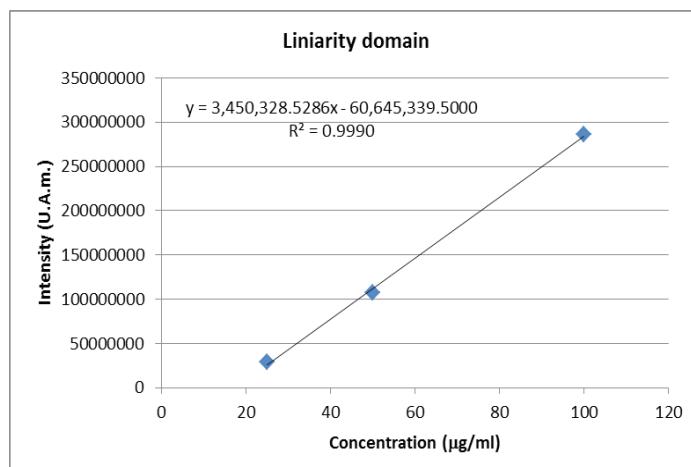


Figure 4. Linearity domain of 4-aminobiphenyl  
Figura 4. Domeniu de liniaritate 4-aminobifenil

Linear regression equation function is of the form:

$$y = 3450328,586x - 60645339,50$$

b= slope calibration  
b= 3450328,586 area units  $\times \mu\text{g}^{-1}$   
R<sup>2</sup> = 0,9990

Ecuația funcției de regresie liniară este de forma:

$$y = 3450328,586x - 60645339,50$$

b = panta curbei de etalonare  
b = 3450328,586 unități arie  $\times \mu\text{g}^{-1}$   
R<sup>2</sup> = 0,9990

Table 5: Values of limit of detection, limit of quantification and working range

Tabelul 5: Valorile limitei de detecție, limitei de cuantificare și domeniului de lucru

	Formula Formula	Value Valoare
Limit of detection <i>Limita de detecție</i>	LoD = 3 s	0.1447 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Limit of quantification <i>Limita de cuantificare</i>	LoQ = 10 s	0.0482 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Working range <i>Domeniul de lucru</i>		
Lower limit <i>Limita inferioară</i>	LI = 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
Upper limit <i>Limita superioară</i>	LS = 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	

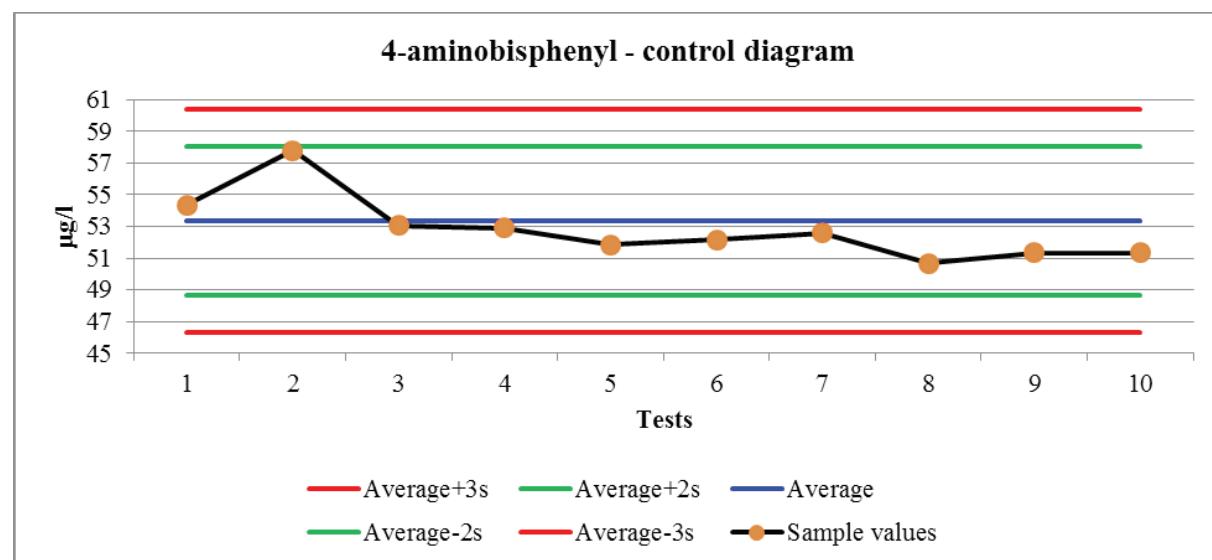


Figure 5. 4-aminobisphenyl control diagram  
Figura 5. Diagrama de control 4-aminobisfenil

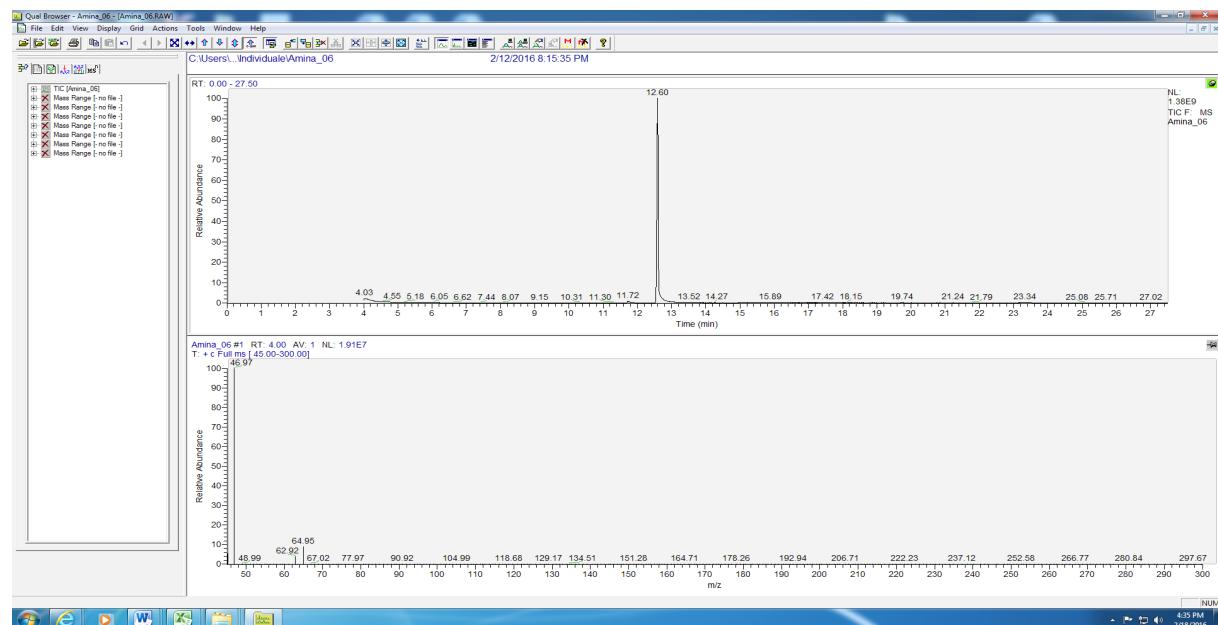


Figure 6. 4-aminobisphenyl GC-MS chromatogram  
Figura 6. Cromatograma GC-MS pentru 4-aminobisfenil

### Benzidine Determination and Method Validation

### Determinarea benzidinei și validarea metodei

Concentration <i>Concentrație</i>	50 µg/ml
Compound <i>Compus</i>	Benzidine <i>Benzidină</i>
Number of analyses <i>Număr de analize</i>	8

Table 6: Initial data of benzidine

Table 6: Date initiale benzidină

$Y_i$ Integrated mass units $Y_i$ <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) $X_i$ <i>(det., în µg/ml)</i>	$Y_i$ Integrated mass units $Y_i$ <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) $X_i$ <i>(det., în µg/ml)</i>
18907936	52.45	20498313	54.76
18015238	51.16	18314791	51.59
18300144	51.57	18135322	51.33
20753972	55.13	15793059	47.93

Table 8: Interpretation of results

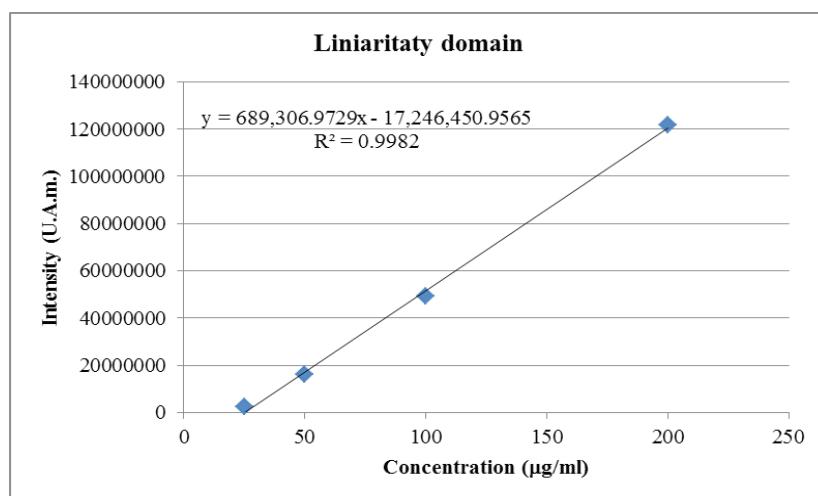
Tabelul 8: Interpretarea rezultatelor

Accuracy <i>Exactitatea</i>	Range <i>Domeniu</i>	Value <i>Valoare</i>
Accuracy / Exactitate % $\frac{X_{mediu}}{\mu} = 100$	90-110%	103.98
Bias % = $\frac{X_{mediu} - \mu}{\mu} \times 100$	-	3.98 %
Reliability <i>Fidelitatea</i>	Range <i>Domeniu</i>	Value <i>Valoare</i>
CV (RSD) % = $\frac{s}{X_{mediu}} \times 100$	2-20%	4.34
Repeatability <i>Repetabilitatea</i>		
$r = 2.8 \times s_r$		5.43 $\mu\text{g/ml}$

Table 9: Sensitivity

Tabelul 9: Sensibilitatea

$Y_i$ Integrated mass units $Y_i$ unități de masă integrate	$X_i$ (det., in $\mu\text{g/ml}$ ) $X_i$ (det., în $\mu\text{g/ml}$ )
28744397	25
107173802	50
285953275	100
1121860955	200

Figure 7. Benzidine linearity domain  
Figura 7. Domeniu de liniaritate benzidină

Linear regression equation function is of the form:

$$y = 689306,9729x - 17246450,9565$$

b= slope calibration  
 b = 689306,9729 area units x  $\mu\text{g}^{-1}$   
 R<sup>2</sup> = 0,9982

Ecuația funcției de regresie liniară este de forma:

$$y = 689306,9729x - 17246450,9565$$

b= panta curbei de etalonare  
 b = 689306,9729 unități arie x  $\mu\text{g}^{-1}$   
 R<sup>2</sup> = 0,9982

Table 10: Values of limit of detection, limit of quantification and working range

Tabelul 10: Valorile limitei de detecție, limitei de cuantificare și domeniului de lucru

	Formula Formula	Value Valoare
Limit of detection <i>Limita de detecție</i>	LoD = 3 s	0.4616 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Limit of quantification <i>Limita de cuantificare</i>	LoQ = 10 s	1.5387 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Working range <i>Domeniul de lucru</i>		
Lower limit <i>Limita inferioară</i>	LI = 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
Upper limit <i>Limita superioară</i>	LS = 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	

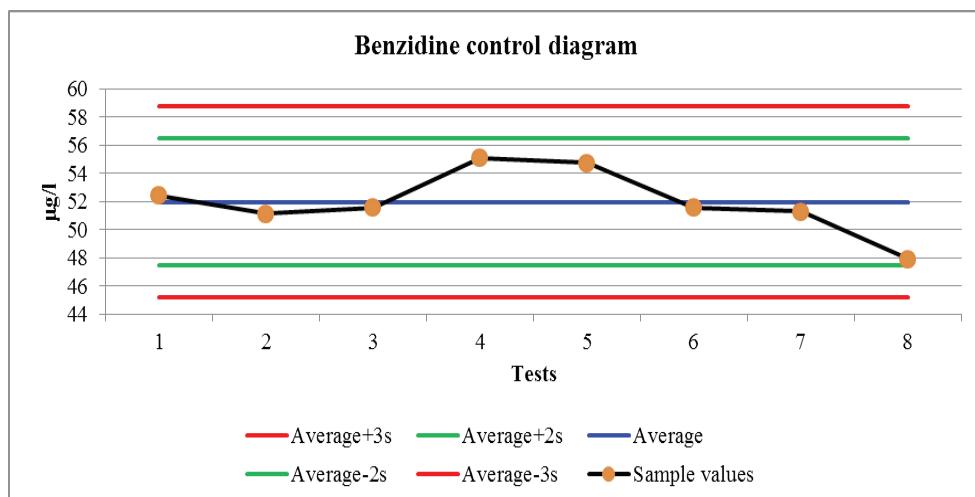


Figure 8. Benzidine control diagram

Figura 8. Diagrama de control benzidina

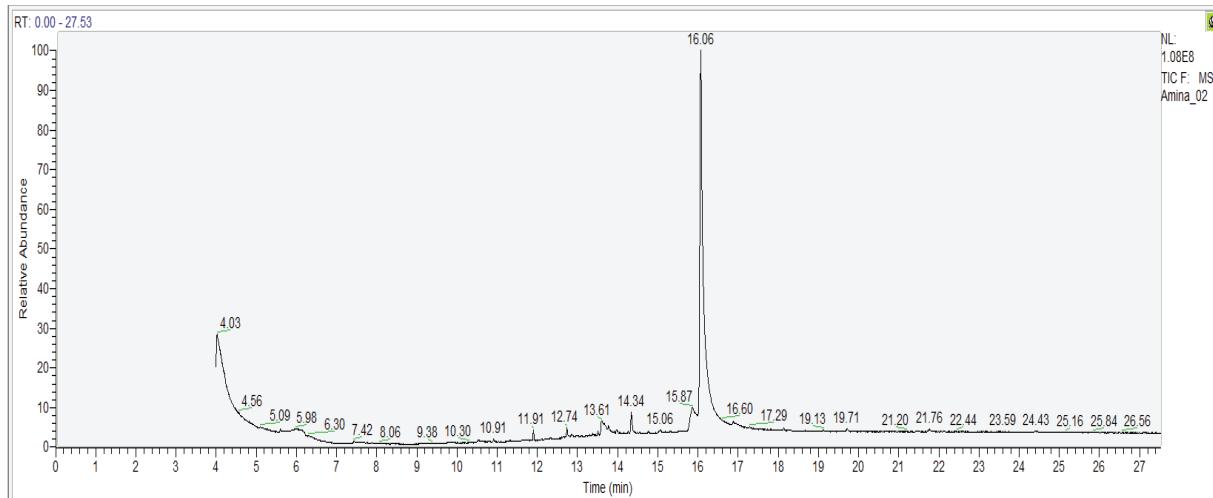


Figure 9. Benzidine GC-MS chromatogram

Figura 9. Cromatograma GC-MS pentru benzidină

### 5-nitro-o-toluidine Determination and Method Validation

### Determinarea 5-nitro-o-toluidinei și validarea metodei

Table 11: Initial data of 5-nitro-o-toluidine

Tabelul 11: Date inițiale 5-nitro-o-toluidină

Concentration <i>Concentrație</i>	50 µg/ml
Compound <i>Compus</i>	5-nitro-o-toluidine <i>5-nitro-o-toluidină</i>
Number of analyses <i>Număr de analize</i>	10

Table 12: Results obtained from 5-nitro-o-toluidine analysis

Tabelul 12: Rezultate obținute din analiza 5-nitro-o-toluidinei

$Y_i$ Integrated mass units <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) <i>X<sub>i</sub></i> (det., în µg/ml)	$Y_i$ Integrated mass units <i>unități de masă integrate</i>	$X_i$ (det., in µg/ml) <i>X<sub>i</sub></i> (det., în µg/ml)
1572098500	52.45	139261807	51.59
1497543548	51.16	1377947260	51.33
1569498199	51.57	1285159747	47.93
1492700267	55.13	1302565826	61.00
1466693430	54.76	1258529985	56.48

Table 13: Interpretation of results

Tabelul 13: Interpretarea rezultatelor

Accuracy Exactitatea	Range Domeniu	Value Valoare
Accuracy / Exactitate % $\frac{X_{mediu}}{\mu} = 100$	90-110%	106.68
Bias % $\frac{X_{mediu} - \mu}{\mu} = 100$	-	6.68 %
Reliability Fidelitatea	Range Domeniu	Value Valoare
CV (RSD) % = $\frac{s}{X_{mediu}} \times 100$	2-20%	6.81
Repeatability Repetabilitatea		
$r = 2.8 \times s_r$		10.17 µg/ml

Table 14: Sensitivity

Tabelul 14: Sensibilitatea

$Y_i$ Integrated mass units $Y_i$ unități de masă integrate	$X_i$ (det., in µg/ml) $X_i$ (det., în µg/ml)
57831736	25
229164260	50
559559916	100
1745104501	200

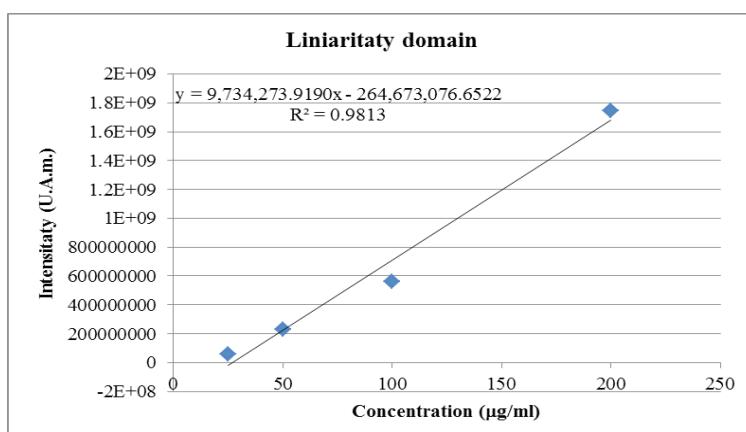


Figure 10. 5-nitro-o-toluidine linearity domain  
Figura 10. Domeniu de liniaritate 5-nitro-o-toluidină

Linear regression equation function is of the form:

$$y = 9734273,9190x - 264673076,6522$$

b= slope calibration

b= 9734273,9190 area units x  $\mu\text{g}^{-1}$

$R^2 = 0,9813$

Ecuația funcției de regresie liniară este de forma:

$$y = 9734273,9190x - 264673076,6522$$

b= panta curbei de etalonare

b= 9734273,9190 unități arie x  $\mu\text{g}^{-1}$

$R^2 = 0,9813$

Table 15: Values of limit of detection, limit of quantification and working range

Tabelul 15: Valorile limitei de detecție, limitei de cantificare și domeniului de lucru

	Formula Formula	Value Valoare
Limit of detection <i>Limita de detecție</i>	LoD = 3 s	3.9114 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Limit of quantification <i>Limita de cantificare</i>	LoQ = 10 s	13.038 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Working range <i>Domeniul de lucru</i>		
Lower limit <i>Limita inferioară</i>	LI = 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
Upper limit <i>Limita superioară</i>	LS = 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	

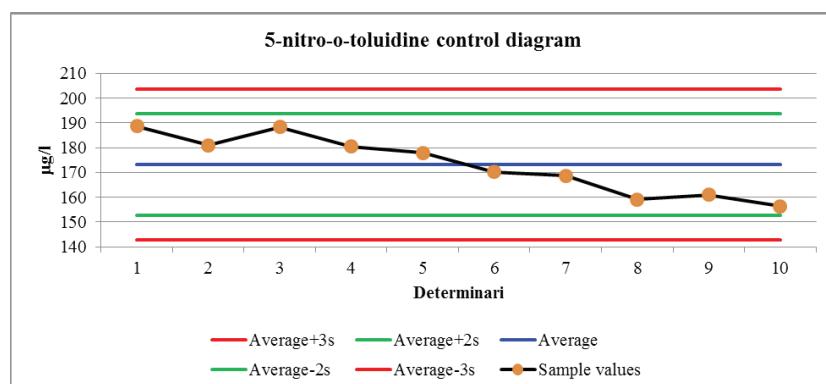


Figure 11. 5-nitro-o-toluidine control diagram  
Figura 11. Diagrama de control 5-nitro-o-toluidină

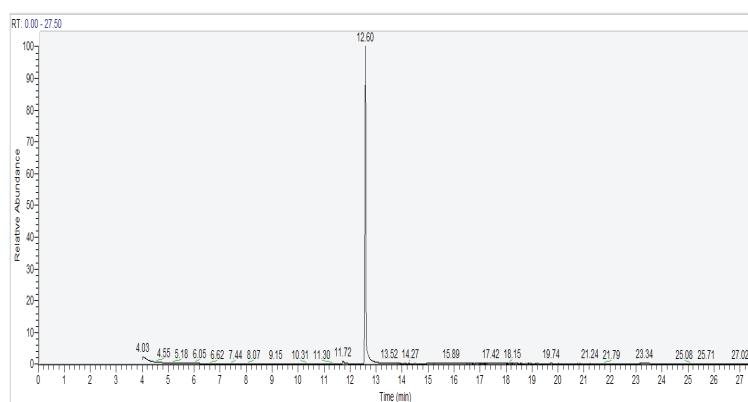


Figure 12. 5-nitro-o-toluidine GC-MS chromatogram  
Figura 12. Cromatograma GC-MS pentru 5-nitro-o-toluidină

## CONCLUSIONS

This paper presents the implementation of a gas chromatographic instrumental method for determining aryl amines and its validation.

The official leather testing method is established by EN ISO 17234-1:2015: "Leather -- Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers -- Part 1: Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants".

The calculation of performance parameters for the studied method leads to the following conclusions:

- linearity range of the method is between 12-200 µg/ml, where the correlation coefficient was in the range of 0.9857-0.9990. For good linearity, the correlation coefficient that characterizes the regression must be between 0.980 and 1;
- detection limit of the amines ranges from 0.46 µg/ml to 4.4 µg/ml;
- the limit of quantification of the amines ranges from 1.53 µg/ml to 14.8 µg/ml;
- the accuracy is between 86.61% and 106.75% and represents the approximation of the actual value and the value found in the sample. For a gas chromatographic method, the accuracy performance must be within 85-110%;

The validated analytical method for the determination of aromatic amines in leather meets all the conditions required to be used and applied for the stated purposes.

It has been shown that this method can be used as it is repetitive and reproducible.

### Acknowledgment

This study was funded by ANCSI in the 2016-2017 national research program, project code PN 16 34 04 03, contract no. 26/14.03.2016.

## CONCLUZII

Lucrarea prezintă implementarea unei metode instrumentale gaz-cromatografice pentru determinarea aril aminelor și validarea acesteia.

Metoda de testare oficială pentru piele este stabilită prin standardul EN ISO 17234-1:2015: „Analize chimice pentru determinarea anumitor colorați azoici din piele vopsite – Partea 1 – Determinarea anumitor amine aromatice derive din colorații azoici”.

Din calculul parametrilor de performanță ai metodei studiate reies următoarele concluzii:

- Domeniul de liniaritate al metodei este cuprins între 12 – 200 µg/ml interval în care valoarea coeficientului de corelație a fost cuprins în intervalul 0,9857 – 0,9990. Pentru o bună liniaritate, coeficientul de corelație ce caracterizează dreapta de regresie trebuie să fie cuprins între 0,980 și 1;
- Limita de detecție a aminelor variază între 0,46 µg/ml și 4,4 µg/ml;
- Limita de cantificare a aminelor variază între 1,53 µg/ml și 14,8 µg/ml;
- Exactitatea metodei este cuprinsă între 86,61% și 106,75% și reprezintă apropierea dintre valoarea reală și valoarea găsită în probă de analizat. Pentru o metodă gaz cromatografică, performanța pentru exactitate trebuie să fie cuprinsă între 85-110%;

Metoda analitică validată pentru determinarea conținutului de amine aromatice din piele îndeplinește toate condițiile necesare pentru a fi folosită și aplicată în scopurile propuse.

S-a demonstrat că această metodă poate fi folosită deoarece prezintă repetitivitate și reproductibilitate.

### Mulțumiri

Acest studiu a fost finanțat de ANCSI în cadrul programului nucleu 2016-2017, cod proiect PN 16 34 04 03, contract 26/14.03.2016.

## REFERENCES

1. Deselnicu, D.C., Vasilescu, A.M., Purcarea, A.A., Militaru, G., Sustainable consumption and production in the footwear sector, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2014**, 14, 3, 159-180.
2. Deselnicu, V., Deselnicu, D.C., Vasilescu, A.M., Purcarea, A.A., Militaru, G., EU Policy for Sustainable Consumption and Production – EU Ecolabel for footwear, Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2014, 23-25 October **2014**, Bucharest, 641-646.
3. Deselnicu, D.C., Crudu, M., Ioannidis, I., Brugnoli, F., Environmental aspects for leather from a life-cycle perspective. Part I: Methodology, Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2014, 23-25 October **2014**, Bucharest, 415-420.
4. Deselnicu, D.C., Crudu, M., Ioannidis, I., Brugnoli, F., Environmental aspects for leather from a life-cycle perspective. Part II: Impact assessment, Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2014, 23-25 October **2014**, Bucharest, 421-426.
5. Albu, L., Popescu, M., Deselnicu, V., Albu, E., Zainescu, G., Study and practice on alternative eco-friendly process for leather manufacture, Proceedings of the 3rd International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2010, 16-18 September **2010**, 471-476.
6. Crudu, M., Deselnicu, V., Mutlu, M.M., Gulumser, G., Bitlisi, B.O., Basaran, O., Adiguzel Zengin, A.C., New tanning agents based on titanium and zirconium, Proceedings of the 3rd International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2010, 16-18 September **2010**, 27-32.
7. Deselnicu, V., Arca, E., Badea, N., Maier, S.S., Deselnicu, D.C., Alternative process for tanning leather, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2008**, 8, 4, 25-34.
8. Albu, L., Deselnicu, V., Miriciu, M., BAT theory and practical reality in Romanian tanneries, Proceedings of the 5th International Conference in Management of Technological Change, book 1, **2007**, 11-20.
9. Crudu, M., Deselnicu V., Ioannidis, I., Crudu, A., New wet white tanning Agents and Technologies, Proceedings of the 4th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2012, 27-29 September **2012**, 27-34.
10. Deselnicu V., Crudu, M., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., Synthetic organic tanning system, Proceedings of the 4th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2012, 27-29 September **2012**, 41-48.
11. Zăinescu, G., Albu, L., Deselnicu, D., Constantinescu, R.R., Vasilescu, A.M., Nichita, P., Sirbu, C., A new concept of complex valorization of leather wastes, *Mase Plastice*, **2014**, 51, 1, 90-93.
12. Deselnicu, D.C., Ioannidis, I., Emerging market for FOC-leather articles: A real need or just marketing edge, Proceedings of the 4th International Conference on Advanced Materials and Systems - ICAMS 2012, 27-29 September **2012**, 35-40.
13. Constantinescu, R.R., Deselnicu, V., Crudu, M., Macovescu, G., Albu, L., Comparative Study Regarding Leather Biodegradability, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2015**, 15, 2, 73-84.

14. Deselnicu, V., Crudu, M., Zăinescu, G., Albu, M.G., Deselnicu, D.C., Guță, S.A., Ioannidis, I., Gurău, D., Alexandrescu, L., Constantinescu, R.R., Chirilă, C., Macovescu, G., Bostaca, G., Innovative Materials and Technologies for Sustainable Production în Leather and Footwear Sector, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2014**, 14, 3, 147-158.
15. Brugnoli, F., Gonzalez-Quijano, G., Albu, L., The First Social & Environmental Report of the European Leather Industry, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2013**, 13, 1, 21-48.
16. <https://en.wikipedia.org/wiki/Benzidine>.
17. <https://en.wikipedia.org/wiki/4-Aminobiphenyl>.

Article received/Data primirii articolului: 09.06.2016

Accepted/Acceptat la data: 18.07.2016