

Fenylohydrazyna

Metoda oznaczania na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej¹

Phenylhydrazine

Determination in workplace air with high pressure liquid chromatography

dr MAREK ZIELIŃSKI

<https://orcid.org/0000-0001-8439-1229>

e-mail: marek.zielinski@imp.lodz.pl

mgr MARZENA BONCZAROWSKA

<https://orcid.org/0000-0003-3612-0656>

e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl

mgr EWA TWARDOWSKA

<https://orcid.org/0000-0001-9158-3536>

e-mail: ewa.twardowska@imp.lodz.pl

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi

Nofer Institute of Occupational Medicine of Lodz, Poland

Numer CAS 100-63-0

Streszczenie

Fenylohydrazyna w temperaturze pokojowej występuje w postaci bezbarwnej oleistej cieczy o słabym, aromatycznym zapachu. Jest stosowana w syntezie organicznej jako silny środek redukujący lub jako półprodukt przy produkcji innych związków chemicznych (m.in. barwników i leków). Wykorzystuje się ją również jako odczynnik chemiczny służący do identyfikacji aldehydów i ketonów oraz identyfikacji i określania konfiguracji cukrów. Do organizmu człowieka fenylohydrazyna może dostawać się drogą inhalacyjną, pokarmową lub na drodze bezpośredniego kontaktu ze skórą. Gdy zostanie wchłonięta, szybko wiąże się z hemoglobiną. Toksyczne działanie fenylohydrazyny polega głównie na uszkodzeniu czerwonych krwinek skutkującym anemią hemolityczną i w konsekwencji uszkodzeniem śledziony i wątroby. Fenylohydrazyna może również działać uczulająco oraz powodować kontaktowe zapalenia skóry. Celem prac badawczych było opracowanie i walidacja czulej metody oznaczania stężeń fenylohydrazyny w środowisku pracy w zakresie $1/10 \div 2$ NDS zgodnie z wymogami normy PN-EN 482.

Badania wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Waters Alliance 2695 wyposażonego w pompę poczworną, kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 ($150 \times 2,1$ mm, $5 \mu\text{m}$), detektor spektrofotometryczny (UV-VIS) i autosampler.

Metoda polega na: adsorpcji fenylohydrazyny na żelu krzemionkowym pokrytym $0,1$ mol/l kwasem solnym, ekstrakcji zatrzymanego związku mieszaniną acetonitrylu i wody, derywatywacji fenylohydrazyny acetonem oraz oznaczaniu powstałej pochodnej metodą HPLC. Współczynnik desorpcji fenylohydrazyny z żelu krzemionkowego pokrytego HCl wynosi $0,96$. Metoda jest liniowa ($r = 0,9996$) w zakresie stężeń $11,4 \div 228 \mu\text{g/ml}$, co odpowiada zakresowi $0,19 \div 3,80 \text{ mg/m}^3$ dla próbki powietrza o objętości 180 l. Granica oznaczalności (LOQ) wynosi $0,027 \mu\text{g/ml}$.

Opisana metoda analityczna umożliwi oznaczenie w powietrzu na stanowiskach pracy stężenia fenylohydrazyny równego $0,19 \text{ mg/m}^3$ ($1/10$ wartości NDS). Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością i spełnia wymagania normy PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach IV etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Opracowana metoda oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: fenylohydrazyna, metoda oznaczania, metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

Phenylhydrazine is colorless oily liquid with a weak aromatic odor. Phenylhydrazine is used in organic synthesis as a strong reducing agent or as an intermediate in the synthesis of other chemical compounds (in the production of dyes and medicines). It is also used as a chemical reagent to identify aldehydes and ketones as well as to identify and determine the configuration of sugars. Phenylhydrazine may enter the human body by inhalation, ingestion or by direct contact with the skin. Adsorbed, it binds quickly to hemoglobin. The toxic effect of phenylhydrazine is to damage red blood cells. This may cause hemolytic anemia and, consequently, damage to the spleen and liver. This compound can also be sensitizing and cause contact dermatitis. The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for the determination of phenylhydrazine concentrations in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of the standard PN-EN 482. Studies was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. A Waters Alliance 2695 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, Supelcosil C-18 (150 × 2.1 mm; 5 μm) analytical column, spectrophotometric detector (UV-VIS), and autosampler, was used for chromatographic separations. The method is based on the adsorption of phenylhydrazine on silica gel coated with 0,1 M/l hydrochloric acid, extraction of phenylhydrazine with mixture of acetonitrile and water, derivatization of phenylhydrazine with acetone and determination of resulted derivative by means of HPLC method. Recovery of phenylhydrazine from silica gel coated with HCl amounted to 0,90. Method is linear ($r = 0.9996$) within the investigated working range 11,4 ÷ 228 mg/ml, which is equivalent to air concentrations from 0.19 to 3.80 mg/m³ for a 180 L air sample. Limit of quantification amounted to 0.027 μg/ml. Analytical method described in this paper enables selective determination of phenylhydrazine in workplace atmosphere from 0.19 mg/m³ (1/10 MAC value). The method is characterized by good precision and accuracy and meets the criteria for the performance of procedures for the measurement of chemical agents, listed in EN 482:2006. The method may be used for the assessment of occupational exposure to phenylhydrazine and the associated risk to workers' health. The method for determining phenylhydrazine has been recorded in the form of an analytical procedure (see appendix). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

Keywords: phenylhydrazine, determination method, high performance liquid chromatography, workplace air, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

Fenylohydrazyna w temperaturze pokojowej występuje w postaci bezbarwnej lub żółtej oleistej cieczy o słabym, aromatycznym zapachu. W niższych temperaturach występuje w postaci żółtych kryształów. Jest związkem dobrze rozpuszczalnym w wodzie, rozcieńczonych kwasach oraz chlorowanych rozpuszczalnikach. Miesza się z takimi rozpuszczalnikami jak alkohol, eter, chloroform i benzen.

Fenylohydrazyna otrzymywana jest w reakcji diazowania amin aromatycznych (np. aniliny) za

pomocą azotynu sodu i kwasu solnego, a następnie przez działanie na powstały roztwór siarczanem(IV) sodu i wodorotlenkiem sodu. Związek ten ma charakter zasadowy i w reakcjach z kwasami nieorganicznymi tworzy sole.

Fenylohydrazyna stosowana jest w syntezie organicznej jako silny środek redukujący lub jako półprodukt w syntezie innych związków chemicznych (przy produkcji m.in. barwników i leków). Stosowana jest również jako odczynnik chemiczny służący do identyfikacji aldehydów

i ketonów oraz do identyfikacji i określania konfiguracji cukrów (HSDB 2014).

Do organizmu człowieka fenylohydrazyna może dostawać się drogą inhalacyjną, pokarmową lub na drodze bezpośredniego kontaktu ze skórą. Zaadsorbowana wiąże się szybko z hemoglobina. Toksyczne działanie fenylohydrazyny polega na uszkodzeniu czerwonych krwinek. Może to wywoływać anemię hemolityczną i w konsekwencji uszkodzenie śledziony i wątroby. Związek ten może również działać uczulająco oraz powodować kontaktowe zapalenia skóry. Brak jest danych dotyczących rakotwórczego działania fenylohydrazyny na ludzi. Wyniki badań wskazują jednak na rakotwórcze i mutagenne działanie fenylohydrazyny na zwierzęta (HSDB 2014; Kilanowicz, Skrzypińska-Gawrysiak 2018).

Amerykańska Konferencja Rządowych Higienistów Przemysłowych (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) zaliczyła fenylohydrazynę do grupy A3, czyli do związków o potwierdzonym działaniu rakotwórczym na zwierzęta i nieznanym działaniu na człowieka (ACGIH 2015). Eksperti Unii Europejskiej zaklasyfikowali fenylohydrazynę do kategorii 1B, tj. do grupy substancji, o których wiadomo lub co do których istnieje domniemanie, że są rakotwórcze dla człowieka. Klasyfikację fenylohydrazyny zgodną z tabelą 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrek-

tywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwanego rozporządzeniem CLP (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r.), przedstawiono w tabeli 1.

Obowiązujące wartości NDS i NDSch

Zespół Ekspertów Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN z uwagi na oszacowany (Soćko, Szymczak 2012), nieakceptowalny poziom ryzyka nowotworu płuc ($> 10^{-3}$) związanego z całonocnym narażeniem na fenylohydrazynę w stężeniach równych NDS (20 mg/m^3) obowiązującemu do 2020 r. zarekomendował ponaddwudziestokrotne obniżenie normatywu higienicznego dla tego związku. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 r. obowiązująca obecnie wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla fenylohydrazyny i jej soli w powietrzu na stanowiskach pracy wynosi $1,9 \text{ mg/m}^3$.

Obniżenie wartości NDS było bezpośrednim powodem podjęcia prac związanych z opracowaniem odpowiednio czulej i selektywnej metody oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary stężeń tego związku, a następnie dokonanie oceny narażenia zawodowego.

Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Tabela 1.

Klasyfikacja i oznakowanie fenylohydrazyny zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Carc. 1B Rakotwórczość (kat. 1B)	H350 – może powodować raka
Muta. 2 Działa mutagenie (kat. 2)	H341 – podejrzewa się, że powoduje choroby genetyczne
Acute Tox. 3, inhal. Toksyczność ostra – droga oddechowa (kat. 2)	H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania
Acute Tox. 3, derma Toksyczność ostra – skóra (kat. 3)	H311 – działa toksycznie w kontakcie ze skórą
Acute Tox. 3, oral Toksyczność ostra – droga pokarmowa (kat. 3)	H301 – działa toksycznie po połknięciu
STORE RE 1 Działanie toksyczne na narządy docelowe w następstwie powtarzającego się narażenia (kat. 1)	H372 – powoduje uszkodzenia narządów w następstwie długotrwałego lub powtarzanego narażenia

cd. tab. 1.

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Eye Irrit. 2 Działanie drażniące na oczy (kat. 2)	H319 – działa drażniąco na oczy
Skin Irrit. 2 Działanie drażniące na skórę (kat. 2)	H315 – działa drażniąco na skórę
Skin Sens. 1 Działanie uczulające na skórę (kat. 1)	H317 – może powodować reakcję alergiczną skóry
Aquatic Acute 1 Stwarzające zagrożenie dla środowiska wodnego – zagrożenie ostre (kat. 1)	H400 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W literaturze fachowej dostępne są jedynie nieliczne publikacje dotyczące ilościowego oznaczenia fenylohydrazyny w powietrzu. Związek ten można oznaczać spektrofotometrycznie po wywołaniu barwnej reakcji z kwasem fosfomolibdenowym (Gromiec 1994; NIOSH 1994), molibdenianem amonu (Rawat, Bhattacharjee 1976) lub bezpośrednio po adsorpcji tego związku w wodzie (Krylova 1968). Związek ten oznaczano także metodami elektrochemicznymi (Rastakhiz i in. 2010) lub chromatograficznymi (Bauer i in. 1982; Mosińska 1980; NIOSH 1978). Zgodnie z wymaganiami normy EN-PN 482 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu już od $1/10$ obowiązującej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Opracowana w 2011 r. metoda oznaczania fenylohydrazyny (Brzeźnicki i in. 2012) z uwagi na późniejsze dziesięciokrotne obniżenie wartości NDS nie spełnia kryteriów EN-PN 482. Z tego względu postanowiono przebadać możliwość dostosowania opisanej metody do wymagań normy oraz opracować metodę umożliwiającą chromatograficzne oznaczenie fenylohydrazyny w postaci fenylohydrazonu acetonu.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż do pobierania próbek powietrza do oznaczania stężeń fenylohydrazyny wykorzystuje się najczęściej płuczkę (Krylova 1968; NIOSH 1994; Rawat, Bhattacharjee 1976) zawierające roztwór kwasu solnego lub wodę. Taki sposób pobierania próbek wynika z nietrwałości fenylohydrazyny

w powietrzu. Tylko w jednym przypadku do poboru próbek powietrza wykorzystano filtry z włókna szklanego nasączone roztworem kwasu siarkowego (NIOSH 1978). Metoda ta jednak nigdy nie została zwalidowana i później została zastąpiona metodą wykorzystującą do poboru próbek płuczkę z roztworem kwasu solnego (NIOSH 1994).

Z uwagi na niedogodności związane z pobieraniem próbek powietrza za pomocą płuczek zdecydowano o wykorzystaniu w dalszych badaniach żelu krzemionkowego pokrytego roztworem kwasu solnego.

Próbki powietrza do oznaczania fenylohydrazyny należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w PN-Z-04008-7 za pomocą średnio przepływowych aspiratorów indywidualnych umożliwiających pobieranie powietrza ze strumieniem objętości ok. 1 l/min. Pozostałe założenia opracowywanej metody:

- pobór dwóch próbek w ciągu zmiany roboczej,
- objętość pobranego powietrza na próbkę około 180 l,
- zakres pomiarowy metody $11,4 \div 228 \mu\text{g/ml}$ ($0,19 \div 3,8 \text{ mg/m}^3$).

Aparatura

W badaniach stosowano chromatograf cieczerwody firmy Waters model Alliance 2695, wyposażony w poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, detektor diodowy (UV-VIS) Waters 2996,

termostat kolumny analitycznej, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i akwizycji danych oraz kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 250 × 3 mm, 5 μm. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory średnio przepływowe GilAir 3 firmy Gilian. Ekstrakcji analizowanego związku dokonywano, stosując wytrząsarkę mechaniczną. Do odważania odczynników używano wagi analitycznej firmy Sartorius.

Odczynniki i materiały

Do badań stosowano odczynniki o czystości co najmniej cz.d.a lub do HPLC firm JT Baker (acetonitryl), Sigma-Aldrich (fenylohydrazyna, aceton) i POCh (kwas solny) oraz wodę o czystości do HPLC ze stacji oczyszczania wody Hydrolab R-10. W badaniach wykorzystano ponadto żel krzemionkowy (Supelco), filtry strzykawkowe z membraną z PTFE oraz pipety automatyczne i szkło miarowe klasy A.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej

Podczas opracowywania metody oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy wykorzystano doświadczenia autorów zgromadzone podczas opracowywania metody oznaczania tego związku w 2011 r. (Brzeźnicki i in. 2012). Zasadę metody oparto na opisanej w literaturze zdolności fenylohydrazyny do reakcji ze związkami karbonylowymi (Brewster, McEwan 1968; Fernandes-Whaley i in. 2005). Powstające w jej wyniku związki (fenylohydrazony) można oznaczać metodami chromatograficznymi.

Z danych literaturowych wynika, iż reakcja powstawania fenylohydrazonu acetonu przebiega szybko w środowisku kwaśnym (NIOSH 1994). Powstałą pochodną można oznaczać z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną przy zastosowaniu kolumn analitycznych wypełnionych fazą oktadecylową (C-18).

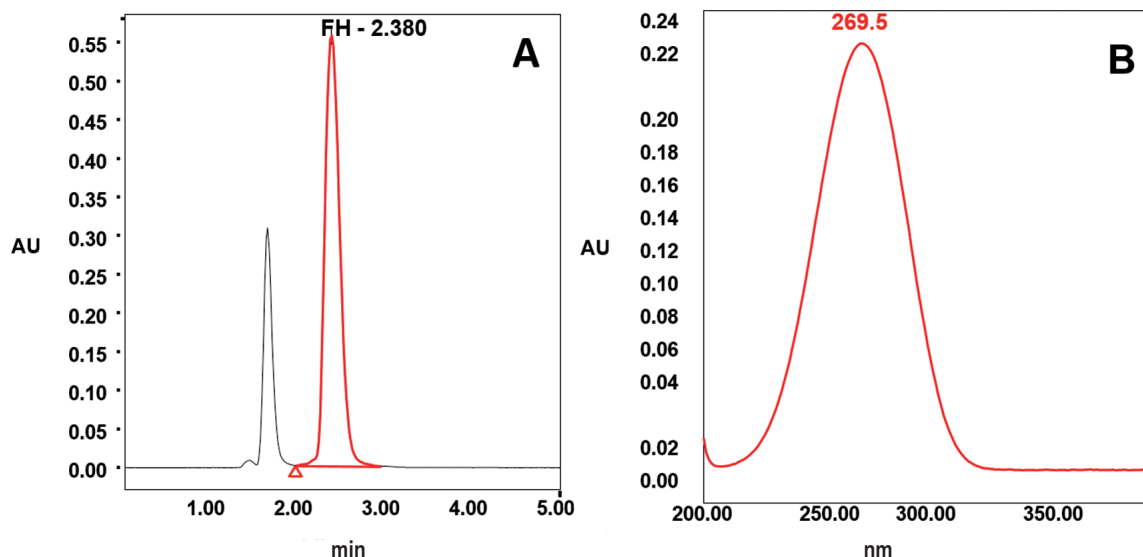
Wszystkie badania dotyczące opracowania metody oznaczania fenylohydrazyny techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykonywano z użyciem kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 (250 × 3 mm, 5 μm). Jako fazy ruchomej (elucja izokratyczna) używano mieszaniny acetonitrylu i wody zmieszanych w proporcjach 6: 4. Doboru optymalnej długości fali analitycznej dokonano na podstawie analizy widma UV pochodnej powstałej w wyniku reakcji fenylohydrazyny z acetonem.

W tabeli 2. podano przykładowe parametry pracy chromatografu cieczowego zapewniające możliwość oznaczenia stężeń fenylohydrazyny w postaci fenylohydrazonu acetonu. Na rysunku 1. przedstawiono chromatogram i widmo UV badanego związku uzyskane przy wykorzystaniu kolumny Supelcosil LC-18. Zastosowanie w oznaczeniach detektora UV-VIS umożliwiającego wykonanie analiz przy długości fali analitycznej $\lambda = 270$ nm zapewnia wystarczającą czułość oznaczeń.

Tabela 2.

Warunki pracy chromatografu cieczowego

Kolumna analityczna Supelcosil LC-18 250 × 3 mm, 5 μm		
Faza ruchoma Program – izokratycznie (v: v)	acetonitryl 60%	woda 40%
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	270 nm (UV-VIS)	
Objętość nastrzyku próbki	10 μl	



Rys. 1. Chromatogram (A) i widmo UV (B) fenylohydrazonu acetonu (FH) na kolumnie Supelcosil LC-18. Detektor UV-VIS, $\lambda = 270$ nm

Badanie zakresu stosowania, liniowości i precyzji metody analitycznej

W celu określenia zakresu roboczego metody przygotowano trzy serie po osiem rurek szklanych o średnicy 10 mm, wypełnionych dwiema sekcjami (200/100 mg) żelu krzemionkowego pokrytego roztworem kwasu solnego, na które naniesiono po 10 μ l acetonitrylowych roztworów wzorcowych fenylohydrazyny o stężeniach: 0; 3,42; 5,10; 10; 17,1; 34,2; 51 i 68,4 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika żel przesypano do naczynek szklanych o pojemności 4 ml, dodawano do niego po 3 ml mieszaniny do ekstrakcji, składającej się w 60% z acetonitrylu i w 40% z wody, a następnie poddano go 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej. Zawartość fenylohydrazyny w 1 ml ekstraktu wynosiła odpowiednio: 0; 11,4; 17; 33,3; 57; 114; 170 i 228 μ g. Ekstrakty przepuszczano przez filtry

strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μ m, następnie 1 ml ekstraktu poddano derywatywacji, dodając 20 μ l acetonu. Po dokładnym wymieszaniu ekstraktu pozostawiano na 120 min. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody przedstawiono w tabeli 3. Z uzyskanych danych wynika, że odpowiedzi detektora UV-VIS w funkcji stężenia fenylohydrazyny w badanym zakresie stężeń 11,4 ÷ 228 μ g/ml mają charakter liniowy. Zależność tę można opisać równaniem $y = 31744x - 141859$. Współczynnik zmienności (CV) ilorazów pól powierzchni pików i odpowiadających im stężeń fenylohydrazyny (współczynniki nachylenia prostej) dla trzech serii roztworów wzorcowych roboczych wynosi 9,84%, a współczynnik regresji $r = 0,9996$. Krzywą wzorcową przedstawiono na rysunku 2.

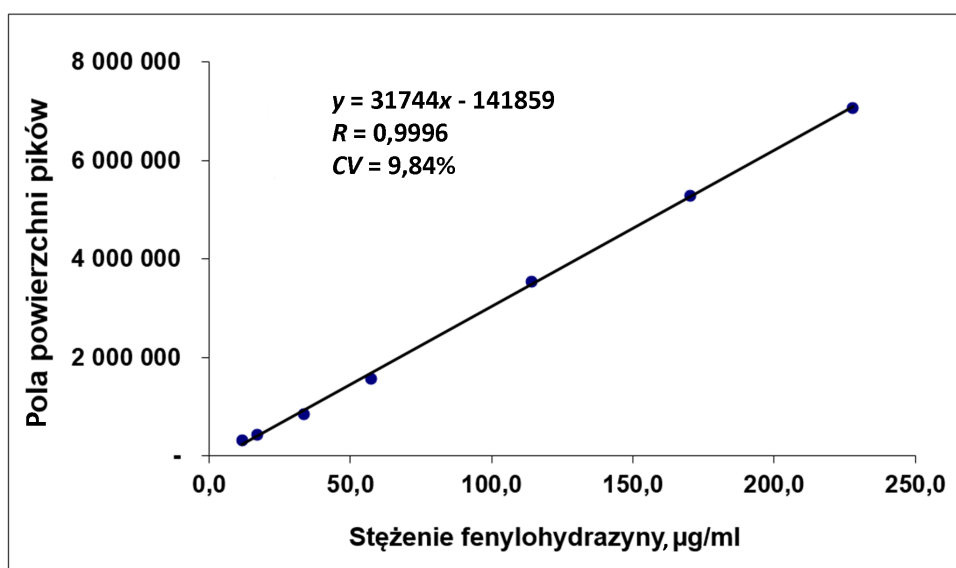
Tabela 3.

Badanie liniowości metody oznaczania fenylohydrazyny

Parametry badane	Stężenie, μ g/ml						
	11,4	17	33,3	57	114	170	228
Pole powierzchni pików	299 074,9	442 111,7	73 512,4	1 353 012,9	3 276 603,7	5 394 969,8	6 910 945,4
	297 950,3	44 371,8	923 972,1	1 674 188,6	3 613 351,0	5 378 191,2	7 053 779,2
	293 145,2	418 025,6	854 940,8	1 671 884,1	3 710 809,6	5 109 513,9	7 239 748,8

cd. tab. 3.

Parametry badane	Stężenie, µg/ml						
	11,4	17	33,3	57	114	170	228
Średnia wartość pola powierzchni pików	296 723,5	431 503,0	838 241,8	1 566 361,9	3 533 588,1	5 294 234,9	7 068 157,6
Odchylenie standardowe, SD	3 149,5	12 296,6	95 184,9	184 769,2	227 827,3	160 167,0	164 872,6
Współczynnik zmienności, CV, %	1,1	2,8	11,4	11,8	6,4	3,0	2,3



Rys. 2. Krzywa kalibracyjna fenylhydrazyny

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano trzy serie po sześć rurek szklanych o średnicy 10 mm, które wypełniono dwiema sekcjami (200/100 mg) żelu krzemionkowego pokrytego 0,1 mol/l kwasem solnym. Na pierwszą warstwę sorbentu (200 mg) naniesiono po 10 µl acetonitrylowych roztworów wzorcowych o stężeniach: 3,42; 17,1 i 68,4 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika pierwszą warstwę żelu przesypano do osobnych naczynek szklanych o pojemności 4 ml. Do próbek dodano 3 ml roztworu ekstrakcyjnego i poddano 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej. Ekstrakty przepuszczono przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 µm. 1 ml każdego ekstraktu przeniesiono do naczynek szklanych

o pojemności 2 ml i poddano derywatyżacji, dodając po 20 µl acetonu. Po dokładnym wymieszaniu próbki pozostawiano na 120 min. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki badań precyzji przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia z zastosowaniem techniki HPLC przedstawiono w tabeli 4. Średnie wartości współczynników zmienności dla badanych stężeń wynoszą: 4,9% dla stężenia 11,4 µg/ml; 5,6% dla stężenia 57 µg/ml i 8,1% dla stężenia 228 µg/ml. Średni (dla trzech stężeń) współczynnik zmienności ilorazów pól powierzchni pików i odpowiadających im stężeń fenylhydrazyny (współczynniki nachylenia prostej) wynosi 8,1%.

Tabela 4.

Wyniki badania precyzji metody oznaczania fenylohydrazyny techniką HPLC

Numer analizy	Stężenie, µg/ml		
	11,4	57	228
1	321 079,9	1 552 988,7	7 450 672,4
2	323 920,6	1 707 788,2	6 710 801,1
3	336 894,8	1 864 365,2	7 024 443,4
4	354 060,7	1 876 694,8	8 094 815,2
5	347 712,3	2 001 947,3	7 830 309,1
6	314 675,8	1 883 134,4	6 996 803,5
Średnia	335 452,8	1 866 786,0	7 331 434,5
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>	16 304,2	104 785,7	596 454,8
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %	4,9	5,6	8,1

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń fenylohydrazyny

Do zbadania ewentualnych strat fenylohydrazyny podczas pobierania próbek powietrza przygotowano trzy serie po sześć rurek szklanych o średnicy 10 mm, które wypełniono dwiema sekcjami (200/100 mg) żelu krzemionkowego pokrytego 0,1 mol/l kwasem solnym. Na pierwszą warstwę sorbentu (200 mg) naniesiono po 10 µl acetonitrylowych roztworów wzorcowych fenylohydrazyny o stężeniach: 3,42; 17,1 i 68,4 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, przez rurki przepuszczono ok. 180 litrów powietrza ze stałym natężeniem przepływu (1 l/min), stosując do tego celu aspiratory GilAir 3. Po przepuszczeniu powietrza każdą warstwę żelu przesypano do osobnych naczynek szklanych o pojemności 4 ml. Do próbek dodano 3 ml roztworu ekstrakcyjnego i poddano 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wstrząsarki mechanicznej. Ekstrakty przepuszczono przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 µm. 1 ml każdego ekstraktu przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 2 ml i poddano derywatywacji, dodając po 20 µl acetonu. Po dokładnym wymieszaniu próbki pozostawiano na 120 min. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną poddawano analizie chromatograficznej. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane

w analizach ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów roztworów wzorcowych o takich samych stężeniach, przez które nie przepuszczano powietrza.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 5. Zgromadzone dane wskazują, że zastosowany sorbent, jak również sposób pobierania próbek powietrza nie powodują istotnych ilościowych strat badanego związku. Średnie wartości współczynnika desorpcji fenylohydrazyny z żelu krzemionkowego pokrytego 0,1-molowym kwasem solnym po przepuszczeniu próbki powietrza o objętości ok. 180 l dla badanych zawartości fenylohydrazyny na żelu (34,2; 171 i 684 µg/żel) wynoszą odpowiednio: 0,93 (*SD* – 0,07); 0,97 (*SD* – 0,07) i 0,98 (*SD* – 0,05). Średni dla trzech analizowanych stężeń współczynnik desorpcji wynosi 0,96 (*SD* – 0,06). Jednocześnie w żadnej z próbek nie stwierdzono obecności fenylohydrazyny w drugiej warstwie żelu.

Tabela 5.

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń fenylhydrazyny

Medium pochłaniające	Zawartość fenylhydrazyny na żelu, μg	Pole powierzchni pików		Współczynnik desorpcji	Średnia wartość współczynnika desorpcji
		wzorzec kontrolny	ekstrakt		
Żel krzemionkowy pokryty 0,1 mol/l HCL	34,2	246 765,7 257 756,1 256 912,4	215 529,6	0,85	0,93
			229 438,6	0,90	
			232 728,7	0,92	
			238 377,4	0,94	
			232 585,0	0,92	
			271 863,7	1,07	
				SD 0,74	
				CV 8,0	
	171	1 796 571,0 1 799 475,1 1 700 016,1	1 541 957,4	0,87	
1 604 580,5			0,91		
17 782 176,6			1,07		
		1 849 907,1	1,05		
		1 809 726,6	1,03		
		1 675 842,2	0,95		
			SD 0,69		
			CV 7,1		
684	7 286 876,4 7 687 236,8 7 380 071,6	6 876 931,9	0,92	0,98	
		7 553 781,9	1,01		
		7 678 258,0	1,03		
		6 876 869,8	0,92		
		7 179 726,2	0,96		
		744 906,7	1,00		
			SD 0,46		
			CV 4,7		
Średni współczynnik desorpcji, \bar{S}_r , %		0,96			
Odchylenie standardowe, SD		0,064			
Współczynnik zmienności, CV , %		6,5			

Badanie trwałości próbek fenylhydrazyny pobranych na żel krzemionkowy pokryty 0,1 mol/l kwasem solnym

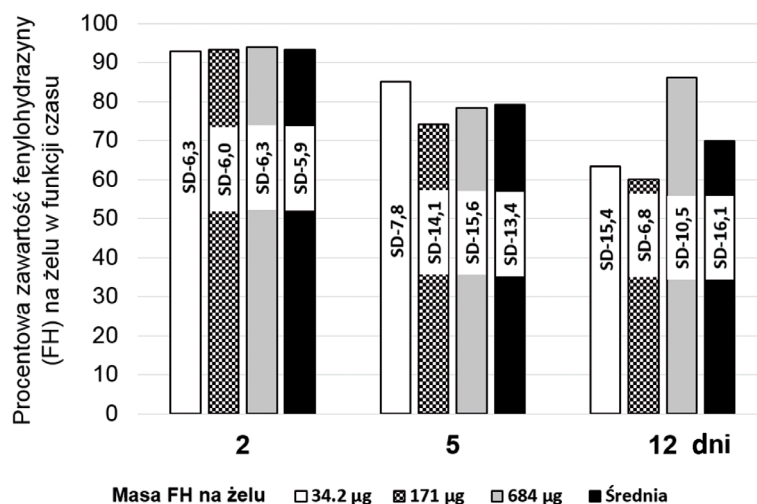
W celu zbadania trwałości próbek fenylhydrazyny pobranych na rurki sorpcyjne wypełnione żelami krzemionkowymi (200/100 mg) pokrytym 0,1 mol/l kwasem solnym przygotowano trzy serie po 18 rurek, na które naniesiono po 10 μl acetonitrylowych roztworów wzorcowych fenylhydrazyny o stężeniach: 3,42; 17,1 i 68,4 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika rurki szczelnie zamykano i umieszczano w chłodziarce. Po 2, 5 i 12 dniach przechowywania pierwszą warstwę żelu przenoszono do wial o pojemności 4 ml i desorbowano przez 30 min przy użyciu 3 ml mieszaniny ekstrakcyjnej i wytrząsarki mechanicznej. Eks-

trakty przepuszczono przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm . Z każdej próbki pobrano 1 ml ekstraktu, przeniesiono do naczynek o pojemności 2 ml i poddano derywatywacji, dodając po 20 μl acetonu. Po dokładnym wymieszaniu próbki pozostawiano na 120 min, a następnie mieszaninę reakcyjną poddawano analizie chromatograficznej. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane w analizach ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania fenylhydrazyny na żelu krzemionkowym pokrytym 0,1 mol/l kwasem solnym przedstawiono na rysunku 3. Zebrane dane wskazują, że próbki fenylhydrazyny pobrane na żel są trwałe tylko

przez 2 dni. Wyrażone w procentach średnie wartości współczynnika desorpcji dla badanych zawartości fenylohydrazyny (3,42; 171 i 684 μg / rurkę z żelem) wynoszą: 92,9% ($SD - 6,3$); 93,3% ($SD - 6,0$) i 94% ($SD - 6,3$). Średnia dla trzech stężeń wartość współczynnika desorpcji wynosi

93,4% ($SD - 5,9$). Dłuższy okres przechowywania próbek (5 i 12 dni) powoduje powstawanie istotnych strat analizowanego związku. Średnia zawartość fenylohydrazyny na żelu po 5 i 12 dniach przechowywania w chłodziarce wynosi odpowiednio 79,2 i 69,6%.



Rys. 3. Wpływ czasu przechowywania na zawartość fenylohydrazyny w próbkach pobranych na żel krzemionkowy pokryty 0,1 mol/l kwasem solnym

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności fenylohydrazyny przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (Zapewnienie jakości... 2004), obliczając odchylenie standardowe sygnałów tła o czasie retencji pochodnej fenylohydrazyny, uzyskanych z analiz ekstraktów 20 próbek zerowych, a następnie, uwzględniając współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej, obliczono granicę wykrywalności (GW) i granicę oznaczalności (GO) dla fenylohydrazyny.

Wyniki analiz dotyczących wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności fenylohydrazyny z zastosowaniem techniki HPLC przedstawiono w tabeli 6. Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego metody wynoszą odpowiednio 0,0084 i 0,0281 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482:2012. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy 11,4 ÷ 228 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(0,19 ÷ 3,80 mg/m^3
dla próbki powietrza
180 l)
- granica wykrywalności 0,0084 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- granica oznaczalności 0,0281 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- współczynnik korelacji $r = 0,9996$
- precyzja badania 8,1%
- względna niepewność całkowita 17,8%.

Tabela 6.

Wyznaczanie granicy wykrywalności (GW) i oznaczalności (GO) fenylohydrazyny

Wyznaczone parametry	Wartości sygnału (pola powierzchni pików)	
		283,0 148,7 386,2 314,1 343,2 456,7 393,6 164,3 400,7 265,9
Średnie pole powierzchni, $n = 20$	308,1	
Odchylenie standardowe, SD	86,5	
Współczynnik zmienności, $CV, \%$	28,1	
Granica wykrywalności, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,0084	
Granica oznaczalności, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,0281	

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano metodę oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy. Fenylohydrazynę w postaci pochodnej z acetonem można oznaczać metodą chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Do pobierania próbek fenylohydrazyny w powietrzu można zastosować żel krzemionkowy pokryty roztworem kwasu solnego o stężeniu 0,1 mol/l. Należy pamiętać, że próbki

fenylohydrazyny pobrane w opisany wyżej sposób są trwałe jedynie przez 2 dni.

Opracowana metoda umożliwia oznaczanie fenylohydrazyny w granicach $0,19 \div 3,80 \text{ mg}/\text{m}^3$, tj. $1/10 \div 2$ wartości obowiązującego NDS. Opracowaną metodę oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy przedstawiono w postaci procedury analitycznej zamieszczonej w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

ACGIH (2015). American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices.

Bauer D., Parrat J., Ruch B. (1982). Industrial hygiene air monitoring of phenylhydrazine. *J. Chromatogr.* 249(2), 238–289.

Brewster R.Q., McEwan W.E. (1968). Podstawy chemii organicznej. Przeł. K. Gałuszko i in. PWN, Warszawa.

Brzeźnicki S., Bonczarowska M., Gromiec J. (2012). Fenylohydrazyna – metody oznaczania [Phenylhydrazine – deter-

mination method]. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]* 1(71), 89–96.

Fernandes-Whaley M., Mühlberger F., Whaley A., Adam T., Zimmermann R., Rohwer E., Walte A. (2005). On-line derivatization for resonance-enhanced multiphoton ionization time-of-flight mass spectrometry: detection of aliphatic aldehydes and amines via reactive coupling of aromatic photo ionization labels. *Anal. Chem.* 77(1), 1–10.

Gromiec J.P. (1994). Metody oznaczania wybranych substancji chemicznych w powietrzu środowiska pracy. Fenylohydrazyna. IMP Łódź [publication in Polish].

- HSDB (2014). Hazardous Substances Data Bank. Phenylhydrazine [<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~qS69qO:1>].
- Kilanowicz A., Skrzypińska-Gawrysiak M. (2018). Fenylhydrazyna i jej sole – w przeliczeniu na fenylhydrazynę. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [Phenylhydrazine and its salts – calculated on phenylhydrazine. Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)]. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment] 4(98), 111–145.
- Krylova N.A. (1968). Determination of phenylhydrazine base in the air. *Gig Sanit.* 33(4), 46–48.
- Mosińska K. (1980). Oznaczanie fenylhydrazyny i aniliny metodą chromatografii gazowej w kontroli produkcji fenylhydrazyny. *Chem. Anal.* 25, 859 [publication in Polish].
- NIOSH (1978). National Institute for Occupational Safety and Health. Sampling and analytical method for hydrazine [<http://www.cdc.gov/niosh/pdfs/78-172i.pdf>].
- NIOSH (1994). National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH manual of analytical methods. Phenylhydrazine: Method 3518 [<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/3518.pdf>].
- PN-EN 482 Powietrze na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Polish standard].
- PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników [Polish standard].
- Rastakhiz N., Kariminik A., Soltani-Nejad V., Roodsaz S. (2010). Simultaneous determination of phenylhydrazine, hydrazine and sulfite using a modified carbon nanotube paste electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* 5(9), 1203–1212.
- Rawat J.P., Bhattacharjee P. (1976). Spectrophotometric determination of phenylhydrazine with ammonium molybdate. *Mikrochimica Acta [Wien] II*, 619–624.
- Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (DzU 2020 poz. 61) [Polish legal act].
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 [Regulation (EC) No 1271/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006].
- Soćko R., Szymczak W. (2012). Fenylhydrazyna i jej związki. Wytyczne szacowania ryzyka zdrowotnego dla czynników rakotwórczych 1, 79–96 [publication in Polish].
- Zapewnienie jakości analiz chemicznych (2004). [Red.] M. Dobecki. IMP Łódź [publication in Polish].

**PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA FENYLOHYDRAZyny
W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY
Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ
Z DETEKcją SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ**

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń fenylohydrazyny (CAS: 100-63-0) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS).

Najmniejsze stężenie fenylohydrazyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,19 mg/m³ dla próbki powietrza o objętości 180 l.

2. Powołanie normatywne

P-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą PN-Z-04008-7:2002 /Az1:2004) Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnej w powietrzu fenylohydrazyny na żelu krzemionkowym pokrytym 0,1-molowym kwasem solnym, wymyciu zatrzymanego związku mieszaniną acetonitryl: woda (60: 40, v: v), przekształceniu w pochodną w reakcji z acetonem i poddaniu ilościowemu oznaczeniu przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczonej z detektorem spektrofotometrycznym (UV-VIS).

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Do wykonania analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki i substancje wzorcowe o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,0002 g.

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji chemicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Użyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich utylizacją.

5. Odczynniki i roztwory

5.1. Fenylohydrazyna

Stosować fenylohydrazynę o czystości wg punktu 4.1.

5.2. Acetonitryl

Stosować acetonitryl o czystości do HPLC.

5.3. Aceton

Stosować aceton o czystości do HPLC.

5.4. Kwas solny

Stosować kwas solny 36-procentowy wg punktu 4.1.

5.5. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

5.6. Mieszanina do ekstrakcji

Sporządzić mieszaninę ekstrakcyjną przez zmieszanie acetonitrylu wg punktu 5.2. i wody wg punktu 5.5. w stosunku objętościowym 60: 40.

5.7. Roztwór kwasu solnego do pokrywania żelu krzemionkowego

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml wg punktu 6.4. odmierzyć 75 ml acetonitrylu wg punktu 5.2. i dodać ok. 0,87 ml kwasu solnego wg punktu 5.4. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem. Zawartość kolby wymieszać. Stężenie kwasu w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,1 mol/l.

5.8. Roztwór wzorcowy podstawowy fenylohydrazyny

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml wg punktu 6.4. odmierzyć ok. 0,4 ml fenylohydrazyny wg punktu 5.1. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitry-

lem wg punktu 5.2. Obliczyć zawartość fenylohydrazyny w 1 ml tak przygotowanego roztworu.

5.9. Roztwór wzorcowy pośredni fenylohydrazyny

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml wg punktu 6.4. odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.8. taką ilość wzorca podstawowego fenylohydrazyny wg punktu 5.8., aby otrzymać stężenie fenylohydrazyny równe 68,4 mg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.2.

5.10. Roztwory wzorcowe robocze fenylohydrazyny

Do siedmiu kolb miarowych o pojemności 1 ml wg punktu 6.4. odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.8. odpowiednio: 0,05; 0,07; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 ml roztworu pośredniego wg punktu 5.9. Kolby uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.2. Stężenia fenylohydrazyny w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 3,42; 5,1; 10; 17,1; 34,2; 51 i 68,4 mg/ml.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie analizy przy długości fali analitycznej $\lambda = 270$ nm.

6.2. Żel krzemionkowy pokryty 0,1-molowym kwasem solnym

Stosować żel krzemionkowy pokryty roztworem kwasu solnego przygotowany w opisany poniżej sposób:

Do kolby okrągłodennej wg punktu 6.6. odważyć ok. 10 g żelu krzemionkowego, zalać roztworem kwasu solnego wg punktu 5.7. i pozostawić na 24 h. Roztwór kwasu odparować za pomocą wyparki wg punktu 6.13.

6.3. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm .

6.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności: 1; 5 i 100 ml.

6.5. Kolba okrągłodenna

Stosować kolbę okrągłodenną o pojemności 200 ml.

6.6. Kolumna chromatograficzna

Stosować chromatograficzną kolumnę analityczną o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm wypełnionej fazą oktadecylową o średnicy 5 μm .

6.7. Naczynka szklane

Stosować naczynka szklane o pojemności 2 i 4 ml.

6.8. Pipety do cieczy

Stosować pipety automatyczne nastawne o pojemności 0,01 ÷ 0,1 ml i 0,1 ÷ 1 ml.

6.9. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości 1 l/min.

6.10. Rurki sorpcyjne do pobierania próbek powietrza

Stosować rurki szklane do pobierania próbek powietrza o średnicy wewnętrznej 10 mm. Przygotować próbki do pobierania próbek powietrza wypełnione dwiema warstwami żelu krzemionkowego (200/100 mg) wg punktu 6.2.

6.11. Waga analityczna

Stosować wagę analityczną umożliwiającą ważenie z dokładnością do 0,0002 g.

6.12. Wytrząsarka mechaniczna

Stosować wytrząsarkę mechaniczną.

6.13. Wyparka

Stosować wyparkę rotacyjną.

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą PN-Z-04008-7:2002 /Az1:2004). Za pomocą zestawu do pobierania próbek powietrza składającego się z pompy ssącej wg punktu 6.9. oraz rurki sorpcyjnej wg punktu 6.10. przepuścić ok. 180 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 1 l/min. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe maksimum 2 dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywne oznaczanie fenylohydrazyny od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.6. oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako przykładowe.

Tabela 1.
Przykładowe warunki chromatograficzne

Kolumna analityczna C-18 250 × 3 mm, 5 μm		
Faza ruchoma Program – izokratycznie (v. v)	acetonitryl 60%	woda 40%
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	270 nm	
Objętość nastrojku próbki	10 μl	

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Przygotować osiem rurek sorpcyjnych wg punktu 6.10. Na pierwszą warstwę sorbentu (200 mg) nanieść za pomocą pipety automatycznej wg punktu 6.8. po 10 μl roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 5.10., na ósmą rurkę nanieść 10 μl acetonitrylu (próbka zerowa). Zawartość fenylhydrazyny na żelu wynosi odpowiednio: 34,2; 51; 100; 171; 342; 510 i 684 μg. Po odparowaniu rozpuszczalnika pierwszą warstwę żelu przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.7. Do każdego naczynka dodać 3 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6. i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej wg punktu 6.12. Ekstrakty przepuścić przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.3. Przenieść 1 ml ekstraktu do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.7. i poddać derywatywacji, dodając po 20 μl acetonu wg punktu 5.3. Po dokładnym wymieszaniu ekstrakty pozostawić na 120 min. Zawartość fenylhydrazyny w 1 ml roztworu wynosi odpowiednio: 11,4; 17; 33,3; 57; 114; 170 i 228 μg. Uzyskane roztwory pochodnej fenylhydrazyny poddać analizie chromatograficznej w warunkach określonych w punkcie 8. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość fenylhydrazyny naniesionej na żel (w mg), a na osi rzędnych wartość pola powierzchni pików badanego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbek powietrza każdą warstwę żelu z rurek sorpcyjnych przenieść do naczynek

o pojemności 4 ml wg punktu 6.7., dodać 3 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6. i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej wg punktu 6.12. Ekstrakty przepuścić przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.3. Przenieść 1 ml ekstraktu do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.7. i poddać derywatywacji, dodając 20 μl acetonu. Po dokładnym wymieszaniu ekstrakty pozostawić na 120 min. Próbkę poddać analizie chromatograficznej. W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtórne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie uwzględnić w obliczeniach.

11. Obliczanie wyniku oznaczenia

Stężenia fenylhydrazyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{m}{V},$$

w którym:

- m – masa fenylhydrazyny odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

12. Protokół z badań

W protokole z badań należy podać następujące informacje:

- powołanie na niniejszą procedurę,
- wszystkie dane konieczne do pełnej identyfikacji próbek,

- wyniki wyrażone w sposób podany w punkcie 11.,
- wszystkie szczegóły niepodane w niniejszej procedurze lub pozostawione do wyboru, a także wszelkie czynniki, które mogły wpłynąć na wyniki.

Adres do korespondencji/Contact details:

dr MARZENA BONCZAROWSKA
e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi
91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8
POLAND