

Joanna Kowalska
Anna Jeżewska

NOWA METODA OZNACZANIA TOLUENO-2,4-DIAMINY I TOLUENO-2,6-DIAMINY W POWIETRZU NA STANOWISKU PRACY

A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF TOLUENE-2,4-DIAMINE
AND TOLUENE-2,6-DIAMINE IN WORKPLACE AIR

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy / Central Institute for Labour Protection – National Research Institute,
Warszawa, Poland
Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych / Department of Chemical, Aerosol and Biological Hazards

STRESZCZENIE

Wstęp: Toluenediaminy są substancjami szkodliwymi. Tolueno-2,4-diamina została sklasyfikowana według rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (Wspólnoty Europejskiej – WE) nr 1272/2008 jako substancja rakotwórcza kategorii 1B, natomiast tolueno-2,6-diamina jako substancja mutagenna kategorii 2. Substancje te wchłaniają się do organizmu człowieka głównie przez układ oddechowy i skórę. Tolueno-2,4-diamina i tolueno-2,6-diamina występują w środowisku pracy w Polsce. Celem badania było opracowanie i walidacja metody oznaczania tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy, która umożliwi jednoczesne oznaczanie stężeń tych substancji w powietrzu na stanowiskach pracy metodą dozometrii indywidualnej. **Materiał i metody:** W artykule przedstawiono metodę oznaczania tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (high-pressure liquid chromatography – HPLC) z detektorem diodowym. Metoda polega na: przepuszczeniu badanego powietrza zawierającego tolueno-2,4-diaminę i tolueno-2,6-diaminę przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), wymyciu osadzonych na filtrze substancji wodą i roztworem wodorotlenku sodu, przeprowadzeniu ekstrakcji ciecz–ciecz z zastosowaniem toluenu, reakcji z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu oraz wymiany rozpuszczalnika na acetonitryl. Tak uzyskany rozwór poddano analizie chromatograficznej. **Wyniki:** Metoda umożliwia oznaczanie tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w obecności innych substancji. W badanym zakresie stężeń (2,88–57,6 µg/ml) uzyskana krzywa wzorcowa jest liniowa. W ustalonych warunkach oznaczania granica wykrywalności (limit of detection – LOD) wynosi: 51,36 ng/ml dla tolueno-2,4-diaminy i 52,93 ng/ml dla tolueno-2,6-diaminy. **Wnioski:** Opracowana metoda umożliwia oznaczanie tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie stężeń 0,004–0,08 mg/m³ dla próbki powietrza 720 l. Med. Pr. 2017;68(4):497–505

Słowa kluczowe: stanowisko pracy, czynnik rakotwórczy, analiza powietrza, diaminotoluen, chlorek dinitrobenzoilu, HPLC

ABSTRACT

Background: Toluenediamines are harmful substances. Toluene-2,4-diamine has been assigned to Carcinogen 1B hazard class, pursuant to Regulation (European Community – EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council, and toluene-2,6-diamine to Mutagen 2 hazard class. The main routes of exposure to toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine are via the respiratory tract and the skin. Toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine occur in the work environment in Poland. The aim of this study was to develop and validate a method for the determination of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine that allows the simultaneous determination of their concentrations in the workplace air by personal sampling. **Material and Methods:** Determination of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine derivatives in acetonitrile were carried out by means of liquid chromatography with a diode assay detector. The method involves passing amine-containing air through sulfuric acid-treated glass fiber filter, washing out the substance settled on the filter, using water and solution of sodium hydroxide, followed by the extraction with toluene, reaction with 3,5-dinitrobenzoyl chloride, replacement of solvent with acetonitrile and analysis of obtained solution. **Results:** The method developed in this study enables the researcher to determine the content of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine in the presence of other hazardous substances. In the specified measuring range (2.88–57.6 µg/ml) calibration curves are linear. Under the optimized conditions of determination, the limit of detection (LOD) values achieved: 51.36 ng/ml for toluene-2,4-diamine and 52.93 ng/ml for toluene-2,6-diamine. **Conclusions:** This method makes it possible to determine the concentration of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine in the workplace air within the specified measuring range of 0.004–0.08 mg/m³ (for air sample volume of 720 l). Med Pr 2017;68(4):497–505

Key words: workplace, carcinogen, air analysis diaminotoluene, dinitrobenzoyl chloride, HPLC

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Joanna Kowalska, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych, ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa, e-mail: jokow@ciop.pl
Nadesłano: 2 września 2016, zatwierdzono: 11 października 2016

WSTĘP

Toluenodiamina (TDA, nr CAS: 25376-45-8) to mieszanina 6 izomerów: tolueno-2,4-diaminy (2,4-TDA), tolueno-2,6-diaminy (2,6-TDA), tolueno-2,3-diaminy (2,3-TDA), tolueno-3,4-diaminy (3,4-TDA), tolueno-2,5-diaminy (2,5-TDA) i tolueno-3,5-diaminy (3,5-TDA). Toluenodiaminy są to ciała stałe, rozpuszczalne w gorącej wodzie, alkoholu, eterze i wielu polarnych rozpuszczalnikach organicznych [1–5]. Toluenodiaminy są ważnymi wielkotonażowymi półproduktami w przemyśle chemicznym.

Toluenodiaminy są substancjami szkodliwymi. Wchłaniają się do organizmu przez układ oddechowy i skórę [1–4]. Wśród izomerów TDA tolueno-2,4-diamina (2,4-TDA, 4-metylo-m-fenylendiamina) i tolueno-2,6-diamina (2,6-TDA, 2-metylo-m-fenylendiamina) są substancjami o działaniu rakotwórczym na zwierzęta [6].

Według rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (Wspólnoty Europejskiej – WE) nr 1272/2008 [7] tolueno-2,4-diamina została sklasyfikowana jako:

- substancja rakotwórcza kategorii 1B (carcinogenic – Carc. 1B) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H350 – „może powodować raka”,
- substancja mutagenna kategorii 2 (mutagenic – Muta. 2) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H341 – „podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne”,
- substancja działająca szkodliwie na rozrodczość kategorii 2 (reprotoxic – Repr. 2) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H361f – „podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub dziecko w łonie matki”,
- substancja toksyczna kategorii 3 (acute toxic – Acute Tox. 3) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H301 – „działa toksycznie po połknięciu”,
- substancja toksyczna kategorii 4 (Acute Tox. 4) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H312 – „działa szkodliwie w kontakcie ze skórą”,
- substancja toksyczna na narządy docelowe w następstwie powtarzanego narażenia kategorii 2 (specific target organ toxicity repeated exposure – STOT RE 2) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H373 – „może spowodować uszkodzenie narządów”,
- substancja uczulająca na skórę kategorii 1 (skin sensitizing – Skin Sens. 1) z przypisanym zwrotem

wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H317 – „może powodować reakcję alergiczną skóry”.

Natomiast tolueno-2,6-diamina została sklasyfikowana [7] jako:

- substancja mutagenna kategorii 2 (Muta. 2) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H341 – „podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne”,
- substancja toksyczna kategorii 4 (Acute Tox. 4) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H312 – „działa szkodliwie w kontakcie ze skórą”,
- substancja toksyczna kategorii 4 (Acute Tox. 4) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H302 – „działa szkodliwie po połknięciu”,
- substancja uczulająca na skórę kategorii 1 (Skin Sens. 1) z przypisanym zwrotem wskazującym rodzaj zagrożenia dla zdrowia H317 – „może powodować reakcję alergiczną skóry”.

W warunkach przemysłowych w wyniku reakcji nitrowania toluenu do dinitrotoluenów, a następnie redukcji dinitrotolenu w obecności żelaza i kwasu chlorowodorowego powstaje mieszanina 4 izomerów: 2,4-TDA, 2,6-TDA, 2,3-TDA i 3,4-TDA [1,2]. Otrzymana mieszanina izomerów może zawierać ok. 80% 2,4-TDA i 20% 2,6-TDA lub 65% 2,4-TDA i 35% 2,6-TDA albo 60% 3,4-TDA i 40% 2,3-TDA [5,8].

Izomery TDA (głównie 2,4-TDA i 2,6-TDA) są stosowane jako surowce do produkcji toluenodiiizocyanianów, z których są wytwarzane poliuretany: pianki, powłoki i elastomery. Toluenodiaminy wykorzystywane są również do wytwarzania: barwników (farby do włosów), inhibitorów korozji, przeciwutleniaczy wyrobów gumowych i innych [1,2,6].

Nie ma dokładnych danych dotyczących narażenia zawodowego na 2,6-TDA, można natomiast znaleźć informacje nt. narażenia na 2,4-TDA, która zazwyczaj występuje w mieszaninie razem z 2,6-TDA. Narażenie na TDA zwykle jest związane z ich produkcją i stosowaniem. Istnieją także doniesienia o narażeniu pracowników na aminy (w tym 2,4-TDA, 2,6-TDA) w trakcie syntezy i stosowania poliuretanów [9–11].

Z zasobów Centralnego Rejestru Danych o Narażeniu na Substancje, Preparaty, Czynniki lub Procesy Technologiczne o Działaniu Rakotwórczym lub Mutagennym, prowadzonego w Instytucie Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi, wynika, że w Polsce liczba pracowników narażonych w zakładach pracy na kontakt z tolueno-2,4-diaminą i tolueno-2,6-di-

aminą w latach 2005–2014 była zmienna (6–206 osób dla 2,4-TDA i 6–25 osób dla produktu technicznego zawierającego 2,6- i 2,4-TDA). Wśród pracowników narażonych przeważały kobiety (średnio 47% dla 2,4-TDA i 82% dla mieszaniny).

Dla tolueno-2,4-diaminy obowiązują w Polsce ustalone wartości: najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), które wynosi 0,04 mg/m³, i najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSch) na poziomie 0,1 mg/m³ [12]. Dla tolueno-2,6-diaminy nie ustalono wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy.

Najczęściej wykorzystywaną techniką analityczną oznaczania 2,4-TDA i 2,6-TDA w powietrzu na stanowiskach pracy jest chromatografia – gazowa [13,14] lub cieczowa [15–17].

W metodzie Agencji Bezpieczeństwa i Zdrowia w Pracy (Occupational Safety and Health Administration – OSHA) nr 65 [13] oznaczano benzydynę, 3,3'-dichlorobenzodienę oraz 2,4-TDA i 2,6-TDA z zastosowaniem chromatografii gazowej. Próbkę powietrza pobierano na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI). Aminy po przeprowadzeniu w pochodną w wyniku reakcji z bezwodnikiem heptafluorobutyrowym oznaczano z zastosowaniem chromatografu gazowego z detektorem wychwytu elektronów (gas chromatograph-electron capture detector – GC-ECD).

W metodzie Narodowego Instytutu Zdrowia i Bezpieczeństwa Pracy (Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH) nr 5516 [15] 2,4-TDA i 2,6-TDA oznaczano w obecności toluendiizocyjanianów z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (high-pressure liquid chromatography with UV detector – HPLC-UV). Próbkę powietrza absorbowano w roztworze 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny w toluenie i tak uzyskaną próbkę poddawano acetylowaniu, następnie odparowywano i ponownie rozpuszczano w metanolu. Zakres pomiarowy tej metody wynosi 3–30 mg/m³ dla próbki powietrza 100 l.

W Polsce jest dostępna metoda oznaczania tolueno-2,4-diaminy, która polega na absorpcji tolueno-2,4-diaminy w roztworze 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny w toluenie, otrzymaniu pochodnej 2,4-bisacetamidotoluenu z bezwodnikiem octowym, przeprowadzeniu jej do roztworu w metanolu i analizie otrzymanego roztworu z zastosowaniem HPLC-UV. Zakres pomiarowy tej metody wynosi 0,01–0,12 mg/m³ dla próbki powietrza 100 l [16,17]. Oznaczalność metody wyno-

si 0,01 mg w 1 m³ powietrza, co odpowiada 1/4 obowiązującej wartości NDS. W polskiej normie oraz w metodzie NIOSH powietrze jest przepuszczane przez roztwory toluenowe 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny zawarte w płuczce. Wadą 2 ostatnich metod jest bardzo szybkie odparowywanie toluenu z płuczek podczas pobierania próbek powietrza, co powoduje dodatkowe narażenie pracownika na pary toluenu.

Zaistniała konieczność opracowania metody oznaczania tolueno-2,4-diaminy obejmującej swoim zakresem przedział stężeń od 1/10 do 2 wartości NDS, zgodnie z wytycznymi zawartymi w normie PN-EN 482 [23]. Postawiono sobie także cel: umożliwienie pobierania próbek powietrza w strefie oddychania pracownika, a więc zgodnie z zasadami dozymetrii indywidualnej, oraz jednoczesne oznaczanie w tej samej próbce powietrza zawartości tolueno-2,6-diaminy, występującej z tolueno-2,4-diaminą w powietrzu na stanowiskach pracy. Nowością opracowanej metody jest zastosowanie filtrów z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI) do zatrzymania i zatężenia oznaczanych substancji oraz przeprowadzenie substancji w pochodne, co umożliwiło zastosowanie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową jako techniki analitycznej.

MATERIAŁ I METODY

Aparatura i wyposażenie pomocnicze

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem diodowym (diode array detector – DAD) sprzężonym on-line. Próbkę wprowadzano za pomocą automatycznego podajnika próbek model G2258-90010 (prod. Agilent Technologies, Niemcy). Do sterowania procesem, oznaczania i zbierania danych zastosowano oprogramowanie ChemStation (prod. Agilent Technologies, Niemcy). Do rozdzielania izomerów toluenodiaminy wykorzystano kolumnę chromatograficzną Ultra C₁₈ o wymiarach 250×4,6 mm, uziarnieniu 5 μm, z przedkolumną 10×4 mm (prod. Restek, USA). Do pobierania próbek powietrza zawierających anality stosowano aspirator AirChek 2000 (prod. SKC, USA). Strumień objętości powietrza kontrolowano za pomocą rotametu stołowego typ ROS-06 (prod. Zakład Automatyki Rotametr, Polska). Filtry umieszczono w próbniku przeznaczonym do pobierania frakcji wdychalnej (prod. Ekohigiena, Polska). Podczas przygotowywania próbek do analizy zastosowano wytrząsarkę mechaniczną WL-2000 (prod. JW Electronic, Polska). Wzor-

ce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (prod. Sartorius Corporation, USA).

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: tolueno-2,4-diaminę (2,4-TDA) (prod. Fluka, Szwajcaria), tolueno-2,6-diaminę (2,6-TDA), tolueno-2,3-diaminę, tolueno-3,4-diaminę (prod. Sigma-Aldrich, USA), chlorek 3,5-dinitrobenzoilu, acetonitryl (prod. Merck, Niemcy), metanol, toluen (prod. JT Baker, Holandia), kwas siarkowy(VI) o stężeniu 25% (v/v), wodorotlenek sodu o stężeniu 30% (v/v) (prod. POCH, Polska) i wodę o wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (prod. Millipore, USA). Do odparowania toluenu z ekstraktów stosowano azot o wysokiej czystości (99,999%) (prod. Multax s.c., Polska). Przygotowano roztwory: kwasu siarkowego(VI) o stężeniu 0,26 mol/l – do naniesienia na filtr z włókna szklanego, wodorotlenku sodu o stężeniu 0,135 mol/l – do zobojętnienia ekstraktu powstałego po wymyciu amin z filtra wodą, chlorku 3,5-dinitrobenzoilu w toluenie o stężeniu 10 mg/ml – do przeprowadzenia amin w pochodne.

Do pobierania próbek powietrza używano filtrów z włókna szklanego o średnicy 25 mm (prod. Whatman, Anglia), na które nanoszono po 200 µl roztworu kwasu siarkowego(VI) i pozostawiano do wyschnięcia.

Zasada metody

Metoda polega na przepuszczeniu badanego powietrza zawierającego tolueno-2,4-diaminę i tolueno-2,6-diaminę przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), co umożliwia pobieranie próbek powietrza zgodnie z zasadami dozimetrii indywidualnej w strefie oddychania pracownika. Po adsorpcji anality są wymywane z filtra wodą i wodorotlenkiem sodu, ekstrahowane toluenem, następnie przeprowadzane w pochodne w reakcji z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu i po zamianie rozpuszczalnika na acetonitryl analizowane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

WYNIKI

Przygotowanie próbek powietrza do analizy chromatograficznej

Do pobierania próbek powietrza zawierającego tolueno-2,4-diaminę i tolueno-2,6-diaminę stosowano filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), podobnie jak w metodzie OSHA nr 65 [13]. Toluenodiaminy z filtra wymywano wodą (2 ml), lekko

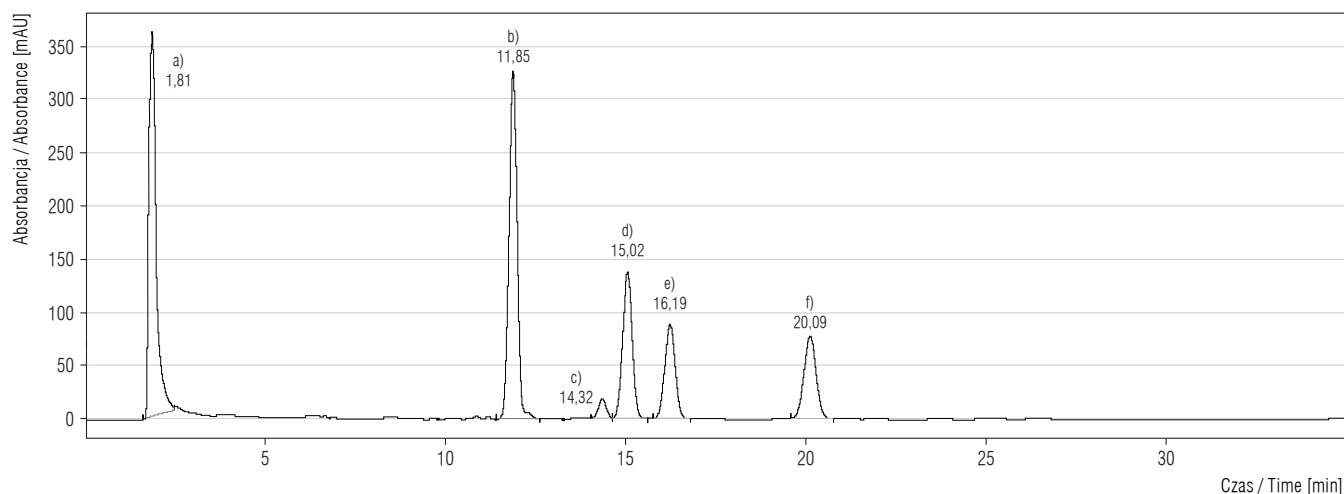
wstrząsając kolbą przez ok. 1 min, a następnie roztworem wodorotlenku sodu (1,5 ml). Na koniec dodawano toluen (1 ml) i kolbą z filtrem wstrząsano przez 30 min. Roztwór z nad filtra przenoszono do próbki i pozostawiano w spoczynku, aż do osiągnięcia stanu równowagi między fazą wodną a toluenową. Następnie pobierano 0,5 ml warstwy toluenowej i przenoszono do naczynka (o pojemności 2 ml) z automatycznego podajnika próbek.

W celu zwiększenia trwałości analitu i podniesienia czułości oznaczenia chromatograficznego zastosowano chlorek 3,5-dinitrobenzoilu jako substancję derywatyżującą, która według danych literaturowych [18–22] reaguje z aminami, dając trwałą pochodną. W trakcie badań dobrano ilość substancji derywatyżującej oraz warunki przeprowadzenia amin w substancję pochodną.

Podczas badań stwierdzono, że reakcja w toluenie tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu przebiega w temperaturze pokojowej właściwie natychmiastowo. Zaproponowano więc następujący sposób dalszego postępowania z próbkami. W naczynku przeprowadza się reakcję derywatyżacji poprzez dodanie do 0,5 ml warstwy toluenowej 20 µl roztworu chlorku 3,5-dinitrobenzoilu w toluenie o stężeniu 10 mg/ml. Zawartość naczynka odparowuje się w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczoną w acetonitrylu (0,5 ml) oznacza się chromatograficznie.

Warunki oznaczania chromatograficznego

Analizę chromatograficzną prowadzono, stosując kolumnę do HPLC typu Ultra C18 (z przedkolumną) w temperaturze 23°C. Dobrany skład fazy ruchomej (acetonitryl: woda (55:45, v/v)) i natężenie przepływu fazy ruchomej (1 ml/min) pozwoliło na rozdzielenie mieszaniny substancji współwystępujących. Na rycinie 1. przedstawiono chromatogram mieszaniny: tolueno-2,4-diaminy, tolueno-2,6-diaminy, tolueno-2,3-diaminy, tolueno-3,4-diaminy i 2,2'-dichoro-4,4'-metylenodaniliny, poddanej reakcji z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu. Pochodna 2,2'-dichoro-4,4'-metylenodaniliny w ustalonych warunkach pojawia się dopiero po 50 min analizy. Długość fali analitycznej wybrano, korzystając z widm pochodnych tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu. Z analizy widma badanych pochodnych wynika, że optymalna długość fali analitycznej do oznaczania stężeń tych związków za pomocą detektora DAD wynosi 232 nm. Objętość dozowanej próbki wynosiła 10 µl.



a – chlorek 3,5-dinitrobenzoilu / 3,5-dinitrobenzoyl chloride, b – pochodna tolueno-2,6-diaminy / toluene-2,6-diamine derivative, c – toluene / toluene, d – pochodna tolueno-2,3-diaminy / toluene-2,3-diamine derivative, e – pochodna tolueno-2,4-diaminy / toluene-2,4-diamine derivative, f – pochodna tolueno-3,4-diaminy / toluene-3,4-diamine derivative.

Długość fali analitycznej / Analytical wave length (λ) = 232 nm.

Ryc. 1. Chromatogram roztworu wzorcowego tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy i substancji współwystępujących (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym – HPLC-DAD)

Fig. 1. Chromatogram of standard solution of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine and coexisting substances (high performance liquid chromatography with diode array detector – HPLC-DAD)

Pobieranie próbek powietrza i analiza

Do pobierania próbek powietrza zawierającego tolueno-2,4-diaminę i tolueno-2,6-diaminę stosowano filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), umieszczone w oprawce i połączone z aspiratorem, jak w metodzie OSHA nr 65 [13]. Sprawdzono także możliwość zastosowania 1 filtra o średnicy 25 mm umieszczonego w oprawce do pobierania frakcji wdychalnej. W tym celu na 4 filtry naniesiono po 25 μ l roztworu tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w metanolu o stężeniu 5,76 mg/ml. Dwa pojedyncze filtry po wyschnięciu umieszczono w oprawce

i podłączono do aspiratora. Przez każdy filtr przepuszczano powietrze z natężeniem przepływu strumienia zalecanym przez producenta oprawki do pobierania frakcji wdychalnej, tj. 2 l/min, przez 6 godz. (720 l powietrza). Za próbki porównawcze posłużyły filtry, przez które nie przepuszczono powietrza. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Pojedynczy filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI) zatrzymał 144 μ g tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy, stąd do pobierania próbek powietrza zaproponowano stosowanie pojedynczego filtra umieszczonego w oprawce.

Tabela 1. Adsorpcja tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy na filtrach z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI) – wybrane próbki

Table 1. Adsorption of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine on sulfuric acid-treated glass fiber filters – selected samples

Substancja Substance	Natężenie przepływu powietrza Air flow rate [l/min]	Czas pobierania próbki Sampling time [min]	Masa substancji na filtrze Mass of substance onto filter [μ g]	Średnia powierzchnia pików Mean peak area
Tolueno-2,4-diamina / / Toluene-2,4-diamine				
próbka / sample 1	2	480	144	2682,3
próbka / sample 2	0	0	144	2781,6
Tolueno-2,6-diamina / / Toluene-2,6-diamine				
próbka / sample 1	2	480	144	2882,3
próbka / sample 2	0	0	144	2840,2

Kalibracja i precyzja

Ze względu na wieloetapowy sposób przygotowania próbki do analizy krzywą kalibracyjną przygotowano poprzez nanoszenie roztworów wzorcowych tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy o wzrastających stężeniach na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym (VI). W tym celu naniesiono na 6 filtrów po 50 µl roztworów wzorcowych tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w metanolu o stężeniach kolejno: 57,6 µg/ml, 72 µg/ml, 144 µg/ml, 288 µg/ml, 576 µg/ml i 1152 µg/ml. Sporządzono 3 serie próbek po 6 filtrów. Roztwory robocze w acetonitrylu uzyskano po przygotowaniu próbki do analizy wg sposobu przedstawionego wcześniej. Parametry charakteryzujące wyznaczone krzywe kalibracyjne przedstawiono w tabeli 2.

Do oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych sporządzono 3 serie, po 8 filtrów każda, z naniesioną tolueno-2,4-diaminą i tolueno-2,6-diaminą o 3 różnych stężeniach: 2,88 µg/ml, 28,8 µg/ml i 57,6 µg/ml. Próbki, po odpowiednim przygotowaniu do analizy (ekstrakcja ciecz–ciecz, derywatywacja), oznaczano chromatograficznie. Z każdej próbki wykonano po 2 pomiary chromatograficzne w warunkach identycznych jak przy oznaczeniach kalibracyjnych. Z danych uzyskanych z chromatogramów obliczono odchylenia standardowe i współczynniki zmienności uzyskanych wyników, na których podstawie obliczono średnią precyzję badania.

Całkowitą precyzję badania wyznaczono, uwzględniając precyzję przyrządu do pobierania próbek ($\pm 5\%$) oraz średnią precyzję metody (tab. 3).

Badanie trwałości próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza w zależności od czasu przechowywania badano w następujący sposób: na 12 filtrów z włókna szklanego pokrytych kwasem siarkowym (VI) nanoszono po 50 µl roztworu tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy o stężeniu 576 µg/ml. Próbki zamknięte w pudełku i osłonięte od wpływu promieniowania słonecznego przechowywano w temperaturze pokojowej. Próbki (po 3 sztuki) analizowano w dniu przygotowania oraz w kolejnych dniach przechowywania. Obliczono średnią zawartość substancji w każdym zestawie 3 filtrów. Na podstawie wyników analizy próbek obliczono parametr – zmiana wyników oznaczenia (w %), jako różnicę między średnią wyników próbek analizowanych natychmiast po pobraniu a średnią wyników próbek powtórzeniowych analizowanych po różnym czasie przechowywania.

Wyniki badań przedstawione w tabeli 4. porównano z wyliczonymi wielkościami całkowitej precyzji badania (tab. 3).

Dane walidacyjne metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z normą europejską PN-EN 482 [23]. Do obliczenia wartości

Tabela 2. Parametry krzywych kalibracji tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy
Table 2. Parameters of the calibration curves for toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine

Parametr Parameter	Tolueno-2,4-diamina Toluene-2,4-diamine	Tolueno-2,6-diamina Toluene-2,6-diamine
Krzywa kalibracji / Calibration curve	$y = 15,31x + 9,03$	$y = 15,81x + 4,3$
Współczynnik korelacji / Correlation coefficient (r)	1,0000	0,9999
Współczynnik kalibracji / Calibration factor (M \pm SD)	16,59 \pm 1,14	16,17 \pm 0,22
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji / Coefficient of variation of the calibration factor [%]	6,88	1,36

M – średnia / mean, SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

y – powierzchnia piku / peak area, x – stężenie toluenodiaminy / concentration of toluenediamine (µg/ml).

Tabela 3. Precyzja oznaczeń kalibracyjnych (N = 8) pochodnych tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy
Table 3. Precision of calibration assays (N = 8) of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine derivatives

Parametr Parameter	Tolueno-2,4-diamina Toluene-2,4-diamine	Tolueno-2,6-diamina Toluene-2,6-diamine
Średnia precyzja / Mean precision [%]	2,69	2,23
Całkowita precyzja badania / Total test precision [%]	5,68	5,47

N – próbki / samples.

Tabela 4. Trwałość próbek powietrza zawierających po 28,8 µg toluenu-2,4-diaminy i toluenu-2,6-diaminy przechowywanych w temperaturze pokojowej

Table 4. Stability of air samples, each containing 28.8 µg of toluene-2,4-diamine and toluene-2,6-diamine stored at room temperature

Substancja Substance	Zmiana powierzchni pików po przechowywaniu próbek powietrza Variation of peak area after air samples storage [%]		
	3 dni 3 days	7 dni 7 days	10 dni 10 days
Toluenu-2,4-diamina / Toluene-2,4-diamine	2,97	10,90	20,50
Toluenu-2,6-diamina / Toluene-2,6-diamine	2,36	10,24	19,53

granicy wykrywalności (limit of detection – LOD) wykorzystano zależność:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times s_0}{b} \quad (1)$$

gdzie:

b – współczynnik nachylenia krzywej kalibracji,
s₀ – odchylenie standardowe 3 serii ślepych próbek.

W celu obliczenia s₀ dla serii próbek ślepych przeprowadzono 10 pomiarów powierzchni pików przy czasie retencji pochodnych badanych analitów dla 3 niezależnie przygotowanych ślepych próbek (próbka przygotowana w identyczny sposób jak próbka rzeczywista, bez analitu).

Dane walidacyjne uzyskane na podstawie wyników przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 5.

OMÓWIENIE

Opisana metoda pobierania próbek powietrza umożliwiła ilościowe zatrzymanie 144 µg toluenu-2,4-diaminy i toluenu-2,6-diaminy przez pojedynczy filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI) (dla 720 l powietrza). Porównanie uzyskanych wyników badania trwałości próbek powietrza z wyliczonymi wielkościami całkowitej precyzji badania wskazuje na to, że próbki zabezpieczone przed światłem, przechowywane w temperaturze pokojowej były trwałe co najmniej 3 dni.

Chlorek 3,5-dinitrobenzoilu reaguje z toluenu-2,4-diaminą oraz toluenu-2,6-diaminą w temperaturze pokojowej, dając trwałe pochodne. Zastosowane warunki oznaczenia chromatograficznego umożliwiły oznaczenie pochodnych toluenu-2,4-diaminy i toluenu-2,6-diaminy w obecności substancji, które mogą współwystępować w oznaczanej próbce powietrza, takich jak: toluenu-2,3-

Tabela 5. Dane walidacyjne metody oznaczania toluenu-2,4-diaminy i toluenu-2,6-diaminy

Table 5. Validation data for the determination method of 2,4-toluenediamine and 2,6-toluenediamine

Parametr Parameter	Toluenu-2,4-diamina Toluene-2,4-diamine	Toluenu-2,6-diamina Toluene-2,6-diamine
Zakres pomiarowy dla 720 l / Measuring range for 720 l [mg/m ³]	0,004–0,080	0,004–0,080
Objętość próbki powietrza / Air sample volume [l]	720	720
Zakres krzywej kalibracyjnej / Calibration curve range [µg/ml]	2,88–57,60	2,88–57,60
Granica wykrywalności / Limit of detection (LOD)		
ng/ml	51,360	52,930
µg/m ³	0,071	0,074
Granica oznaczalności / Limit of quantification (LOQ)		
ng/ml	154,090	158,800
µg/m ³	0,214	0,221
Niepewność całkowita / Overall uncertainty [%]	12,360	11,950
Niepewność rozszerzona / Expanded uncertainty [%]	24,720	23,900

-diamina, tolueno-3,4-diamina, chlorek 3,5-dinitrobenzoilu, toluen i 2,2'-dichloro-4,4'-metylenodianilina.

Ze względu na wieloetapowy sposób przygotowania próbki do analizy krzywą kalibracyjną przygotowano poprzez nanoszenie roztworów wzorcowych tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w metanolu o wzrastających stężeniach na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI). Przy takim sposobie sporządzania krzywej kalibracji nie było potrzeby wyznaczania wydajności odzysku, ponieważ filtry z pobranymi substancjami na stanowiskach pracy były poddawane takiej samej procedurze przygotowania do analizy jak filtry z substancjami naniesionymi w laboratorium do sporządzenia krzywej wzorcowej. Tak uzyskane krzywe kalibracyjne w badanym zakresie stężeń (2,88–57,60 µg/ml) miały przebieg liniowy. Średnie precyzje oznaczeń kalibracyjnych uzyskanych dla 3 poziomów stężeń charakteryzowały się niską wartością (2,69% dla tolueno-2,4-diaminy i 2,23% dla tolueno-2,6-diaminy).

WNIOSKI

Zastosowana metoda pobierania próbek powietrza umożliwia ilościowe zatrzymanie analitów – tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI). Chlorek 3,5-dinitrobenzoilu reaguje z tolueno-2,4-diaminą i tolueno-2,6-diaminą w temperaturze pokojowej, dając trwałe pochodne. Dobrane warunki oznaczania chromatograficznego umożliwiły oznaczanie pochodnych analitów w badanym zakresie stężeń (2,88–57,6 µg/ml). Krzywe kalibracyjne sporządzono poprzez nanoszenie analitów na filtry, a więc z uwzględnieniem etapu przygotowania próbki do analizy. Taki sposób postępowania skraca czas analizy i zmniejsza zużycie odczynników. Opisana metoda umożliwia oznaczanie tolueno-2,4-diaminy i tolueno-2,6-diaminy w obecności pozostałych izomerów toluenodiaminy, a także w obecności toluenu, chlorku 3,5-dinitrobenzoilu i 2,2'-dichloro-4,4'-metylenodianiliny. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN 482 [23] dotyczącej procedur oznaczania czynników chemicznych i może być wykorzystana do oceny narażenia zawodowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Toxnet – Toxicology Data Network [Internet]: United States National Library of Medicine, Bethesda 2015 [cytowany 4 lipca 2016]. Hazardous Substances Data Bank (HSDB).
2. 2,6-Diaminotoluene. Adres: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>
3. Toxnet – Toxicology Data Network [Internet]: United States National Library of Medicine, Bethesda 2015 [cytowany 4 lipca 2016]. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Toluene-2,4-diamine. Adres: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>
4. GESTIS substance database [Internet]: Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance, Sankt Augustin 2016 [cytowany 4 lipca 2016]. 2-Methyl-m-phenylenediamine. Adres: <http://gestis-en.itrust.de>
5. GESTIS substance database [Internet]: Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance, Sankt Augustin 2016 [cytowany 4 lipca 2016]. 4-Methyl-m-phenylenediamine. Adres: <http://gestis-en.itrust.de>
6. United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, World Health Organization: International programme on chemical safety. Diaminotoluenes [Internet]: Organization, Geneva 1987 [cytowany 4 lipca 2016]. Adres: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc74.htm>
7. Roboz J.: Mass spectrometry in cancer research. CRC Press LLC, New York 2002, <https://doi.org/10.1201/9781420042696>
8. Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (zwanego rozporządzeniem GHS). DzU UE z 2008 r., L 353/1
9. Cartolano A.R.: Toluenediamine. W: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, Inc., New York 2005, <https://doi.org/10.1002/0471238961.0409011320151905.a01.pub2>
10. Szczepkowski L., Hernacki S., Gajzler L.: Oznaczanie śladowych ilości amin aromatycznych w spienionych poliuretanach. Polimery 2012;57(11–12):861–864, <https://doi.org/10.14314/polimery.2012.861>
11. Luu H.-M.D., White I.R.: *In-vitro* detection of 2,4- and 2,6-TDA as degradation products of a polyurethane foam. Polym. Degrad. Stabil. 1993;42:245–251, [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(93\)90220-D](https://doi.org/10.1016/0141-3910(93)90220-D)
12. Luu H.-M.D., Biles J., White K.D.: Characterization of polyesterurethane degradation products. J. Appl. Biomater. 1994;5(1):1–7, <https://doi.org/10.1002/jab.770050102>
13. Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Społecznej z dnia 6 czerwca 2014 r. w sprawie najwyższych dopusz-

- czalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU z 2014 r., poz. 817 z późn. zm.
13. United States Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration [Internet]: Department, Salt Lake City 2017 [cytowany 4 lipca 2016]. Benzidine, 3,3'-dichlorobenzidine, 2,4-toluenediamine, 2,6-toluenediamine. Adres: <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org065/org065.html>
 14. Lind P., Dalene M., Skarping G., Hagmar L.: Toxicokinetics of 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed urine and plasma after occupational exposure to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. *Occup. Environ. Med.* 1996;53(2):94–99, <https://doi.org/10.1136/oem.53.2.94>
 15. The National Institute for Occupational Safety and Health: 2,4- and 2,6-toluenediamine (in the presence of isocyanates) [Internet]: Institute, 1994 [cytowany 4 lipca 2016]. Adres: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5516.pdf>
 16. Koziół E.: Tolueno-2,4-diamina. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* 1998;19:174–177
 17. PN-Z-04310:2002. Ochrona czystości powietrza – oznaczanie tolueno-2,4-diaminy na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002
 18. Kirschbaum J., Rebscher K., Brückner H.: Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *J. Chromatogr. A* 2000;881:517–530, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00257-0)
 19. Jeżewska A., Buszewski B.: 2,2'-Dichloro-4,4'-metylenodianilina – metoda oznaczania. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* 2010;1(63):125–130
 20. Jeżewska A., Buszewski B.: A new method for the determination of 2,2'-dichloro-4,4'-methylenedianiline in workplace air samples by HPLC-DAD. *Toxicol. Mech. Method.* 2011;21(7):554–560, <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.571726>
 21. Buszewski B., Olszowy P., Szultka M., Jeżewska A.: New approaches to extraction techniques in determination of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in air and water solutions. *Talanta* 2012;93:117–121, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.057>
 22. Adegoke O.A.: An overview of applications of pre-column derivatization reactions for the liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals and other compounds. *Afr. J. Pure Appl. Chem.* 2012;6(14):129–140
 23. PN-EN 482+A1:2016-01. Narazenie na stanowiskach pracy – wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2016