



OPRACOWANIE I WALIDACJA METODYKI WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA 1,1'-AZODI(FORMAMIDU) W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODOLOGY
FOR QUANTIFY DETERMINATION OF AZODICARBONAMIDE
IN THE WORKPLACE AIR

Joanna Kowalska, Małgorzata Pośniak

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

INFORMACJE KLUCZOWE

- Wskazane jest przeprowadzenie szacowania narażenia inhalacyjnego pracowników na 1,1'-azodi(formamid) (*azodicarbonamide* – ADCA).
- Izotiocyanian 1-naftyli jest odpowiednim odczynnikiem derywatyzującym do oznaczania ADCA.
- Opracowano nową metodę oznaczania frakcji wdychalnej ADCA w powietrzu.

HIGHLIGHTS

- It is advised to estimate workers' inhalation exposure to azodicarbonamide (ADCA).
- 1-naphthyl isothiocyanate is a suitable derivatizing reagent for determining ADCA.
- A new method for determining the inhalable fraction of ADCA in air has been developed.

STRESZCZENIE

Wstęp: Narażenie zawodowe na 1,1'-azodi(formamid) (*azodicarbonamide* – ADCA) może wystąpić poprzez układ oddechowy lub skórę w miejscach pracy, np. przy produkcji tworzyw sztucznych i gumy, gdzie stosuje się go jako środek spieniający lub zwiększający porowatość. Ze względu na działanie uczulające na drogi oddechowe dla ADCA ustalono wartość dopuszczalną stężenia w powietrzu na stanowiskach pracy. Artykuł przedstawia metodę oznaczania tej substancji w powietrzu. **Materiał i metody:** Metoda oznaczania składa się z następujących etapów: z przepuszczenia powietrza zawierającego ADCA przez filtr z włókna szklanego, ekstrakcji substancji zaadsorbowanej na filtrze acetonitrylem, dodania izotiocyanianu 1-naftyli i analizie uzyskanej pochodnej przy użyciu chromatografii cieczowej. Badania wykonano z wykorzystaniem chromatografu Agilent Technologies serii 1200 z detektorem diodowym przy długości fali analitycznej 220 nm i z kolumną Ultra C18 o długości 25 cm i średnicy 4,6 mm. **Wyniki:** Metoda jest liniowa ($r = 0,9998$) w zakresie stężeń 0,08–1,6 µg/ml. Taki zakres przy pobraniu próbki powietrza o objętości 360 l pozwala oznaczyć 0,002–0,04 mg ADCA w metrze sześciennym powietrza. Granica wykrywalności instrumentu pomiarowego wyniosła 0,03 ng/ml, a granica oznaczalności – 0,10 ng/ml. **Wnioski:** Uzyskane wartości rozszerzonej niepewności pomiarów spełniają wymagania normy europejskiej PN-EN 482. Potwierdzono przydatność metody do oszacowania narażenia inhalacyjnego pracowników na ADCA. *Med Pr Work Health Saf.* 2026;77(2):137–146

Słowa kluczowe: narażenie zawodowe, inżynieria środowiska, metoda oznaczania, nauki o zdrowiu, powietrze na stanowisku pracy, azodikarbonamid

ABSTRACT

Background: Occupational exposure to azodicarbonamide (ADCA) can occur via the respiratory tract or through skin in workplaces, e.g., in the production of plastics and rubber where it is used as a foaming agent or a porosity-increasing agent. Due to the irritant nature of ADCA on the respiratory tract, a concentration limit for it in workplace air has been established. This article presents a method for determining

Finansowanie / Funding: badanie sfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (projekt realizowany w ramach VI etapu programu wieloletniego „Rządowy Program Poprawy Bezpieczeństwa i Warunków Pracy”, nr projektu III.PN.02 pt. „Opracowanie 9 nowych metod oznaczania szkodliwych substancji chemicznych dla potrzeb oceny środowiska pracy”, kierownik projektu: dr Joanna Kowalska).

this substance in air. **Material and Methods:** The determination method consists of the following steps: passing air containing ADCA through a glass fiber filter, extracting the substance adsorbed on the filter with acetonitrile, adding 1-naphthyl isothiocyanate and analyzing the obtained derivative using liquid chromatography. The studies were performed using an Agilent Technologies 1200 series chromatograph with a diode array detector at an analytical wavelength of 220 nm and an Ultra C18 column with a length of 25 cm and a diameter of 4.6 mm. **Results:** The method is linear ($r = 0.9998$) in the working range of 0.08–1.6 $\mu\text{g/ml}$. This range, for an air sample of 360 l, allows for the determination of 0.002–0.04 mg of ADCA per cubic meter of air. The instrument detection limit was 0.03 ng/ml, and the instrument quantification limit was 0.10 ng/ml. **Conclusions:** The obtained values, including precision and expanded uncertainty for measurements, meet the requirements of the European standard PN-EN 482. The usefulness of the method for estimating workers' inhalation exposure to ADCA was confirmed. *Med Pr Work Health Saf.* 2026;77(2):137–146

Key words: occupational exposure, environmental engineering, determination method, health sciences, workplace air, azodicarbonamide

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: 7 października 2025, zatwierdzono: 12 marca 2026

WSTĘP

1,1'-azodi(formamid) (*azodicarbonamide* – ADCA) o numerze CAS 123-77-3 to pochodna mocznika i ciało stałe o barwie od żółtej do pomarańczowej. Jest właściwie nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszcza się w dimetylo-sulfotlenku. Brakuje potwierdzonych informacji o rozpuszczalności ADCA w innych rozpuszczalnikach organicznych [1–3].

1,1'-azodi(formamid) jest stosowany głównie w produkcji tworzyw sztucznych, żywic i gumy jako środek spieniający, dodawany np. w celu zwiększenia porowatości [4–7]. Używa się go również jako środka wybielającego i dojrzewającego w mące zbożowej (pieczenie komercyjne) [4–6]. Jako dodatek do żywności jest znany pod numerem E927 [8]. W wielu krajach stosowanie ADCA jest ograniczone lub nawet zabronione, ponieważ stwierdzono rakotwórcze działanie jego produktów rozkładu, np. semikarbazynu [8,9]. Dlatego powstały metody oznaczania ADCA w mące i innych produktach żywnościowych [10–16].

W Stanach Zjednoczonych i Chinach ograniczone ilości ADCA są uważane za bezpieczne, a jego dodawanie do mąki jest dozwolone do, odpowiednio, 45 i 20 mg/kg [8]. W Polsce nie został dopuszczony do stosowania jako dodatek do żywności [17].

1,1'-azodi(formamid) jest otrzymywany w wyniku reakcji mocznika i hydrazyny [1]. W Unii Europejskiej ma on klasyfikację zharmonizowaną – został zaklasyfikowany jako substancja wykazująca działanie uczulające na drogi oddechowe (kat. 1., *Respiratory/skin sensitization*) oraz przypisano mu zwrot określający rodzaj zagrożenia: H334 – Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania [18].

W 2024 r. Międzyresortowa Komisja ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynn timer

Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zawniosowała do ministra właściwego ds. pracy o przyjęcie dla ADCA wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla frakcji wdychalnej na poziomie 0,02 mg/m³ i najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) na poziomie 0,04 mg/m³ [19]. W Polsce dane o narażeniu zawodowym na ten związek nie są dostępne ze względu na brak obowiązującej wartości dopuszczalnej [19]. W Niemczech ustalono wartość maksymalnego dopuszczalnego stężenia 0,02 mg/m³ i wartość krótkoterminową na tym samym poziomie (dla frakcji wdychalnej i par) [4,20].

W raporcie Narodowego Instytutu Bezpieczeństwa i Higieny Pracy [7] opisano pomiary stężeń ADCA w powietrzu środowiska pracy, gdzie pobierano próbki powietrza przy użyciu filtrów FALP Fluoropore (Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy) – filtry składające się z politetrafluoroetyleny (PTFE) z podkładem z polietyleny i wielkości porów 1,0 μm – w dwuczęściowych kasetach przy przepływie 2 l/min. Procedura analityczna polegała na wymyciu substancji 2 ml dimetylo-sulfotlenku (*dimethyl sulfoxide* – DMSO) i analizie za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*high-performance liquid chromatography* – HPLC) (faza ruchoma: 15% DMSO / 85% chlorku metylenu). Oznaczanie prowadzono przy użyciu detektora ultrafioletowego przy długości fali 276 nm oraz detektora światła widzialnego i długości fali 405 nm. Osiągnięto granicę oznaczalności 5 μg w próbce i granicę wykrywalności 1 μg w próbce.

Metoda nr MDHS92/2 zalecana przez Health and Safety Executive [21] do oznaczenia ADCA w powietrzu polega na pobraniu próbki powietrza na filtr z włókna szklanego lub PTFE, wymyciu zatrzymanej substancji z filtra 3 ml mieszaniny octanu etylu i DMSO (10/3, v/v) i analizowaniu otrzymanego roztworu metodą HPLC. Metoda nr MDHS92/2 zaleca pobieranie próbek za-

również do krótkoterminowych (15 min), jak i długoterminowych (do 8 godz.) oznaczeń o objętości do 960 l. Przygotowywano roztwory kalibracyjne w zakresie stężeń 0–1000 µg/ml. Granice wykrywalności i oznaczalności dla ADCA wyznaczone tą metodą jako 3- i 10-krotność odchylenia standardowego próby ślepej wyniosły, odpowiednio, w przypadku 15-minutowej próbki powietrza pobranej z przepływem 2 l/min, ok. 35 µg/m³ i 100 µg/m³, a w przypadku 8-godzinnej próbki pobranej przy tej samej szybkości przepływu, odpowiednio, 1 µg/m³ i 3 µg/m³ [21]. Wielkości te są odpowiednie do ustalonych w 1996 r. w Wielkiej Brytanii dla ADCA: maksymalnego dopuszczalnego stężenia na poziomie 1 mg/m³ i krótkotrwałego dopuszczalnego stężenia na poziomie 3 mg/m³ [4,20]. Metoda nr MDHS92/2 cechuje się niewystarczającą oznaczalnością dla wartości dopuszczalnych zaproponowanych w Polsce.

W niniejszym artykule przedstawiono badania doświadczalne przeprowadzone w celu opracowania metody oznaczania ADCA, która pozwoli laboratoriom oznaczać zawartość tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie 0,002–0,04 mg/m³. Przeprowadzono także walidację metody, aby potwierdzić jej przydatność do zamierzonego zastosowania.

MATERIAŁ I METODY

Aparatura i wyposażenie pomocnicze

Posługiwano się następującą aparaturą i wyposażeniem:

- chromatografem cieczowym seria 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy) wyposażonym w kolumnę chromatograficzną Ultra C18 o wymiarach 250 × 4,6 mm i o średnicy cząstek wypełnienia 5 µm (Restek, Bellefonte, USA), detektor diodowy (*diode array detector* – DAD) oraz oprogramowanie ChemStation umożliwiające optymalizację parametrów i sterowanie chromatografem, a także zbieranie danych pomiarowych;
- aspiratorami do pobierania próbek powietrza, model GilAir Plus (Sensidyne, St. Petersburg, USA);
- wagą analityczną BP 221S (Sartorius, Bohemia, USA);
- chłodziarkozamrażarką (Ariston, Fabriano, Włochy);
- wytrząsarką WL-2000 (JWE Electronic, Warszawa, Polska).

Odczynniki i materiały

Stosowano następujące odczynniki:

- ADCA 97% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
- ADCA 98,4% (Supelco, Bellefonte, USA),
- DMSO 99,9% (ABCR, Karlsruhe, Niemcy),

- acetonitryl (*acetonitrile* – ACN) (Merck, Darmstadt, Niemcy),
- izotiocyjanian 1-naftyłu (*1-naphthylisothiocyanate* – NIT) >98,5% (Fluka, Poznań, Polska),
- chlorowodorek semikarbazony >99% (Sigma-Aldrich, Tokio, Japonia),
- siarczan hydrazyny (POCH, Gliwice, Polska),
- mocznik >99,5% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy),
- wodę dejonizowaną uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, Burlington, USA).

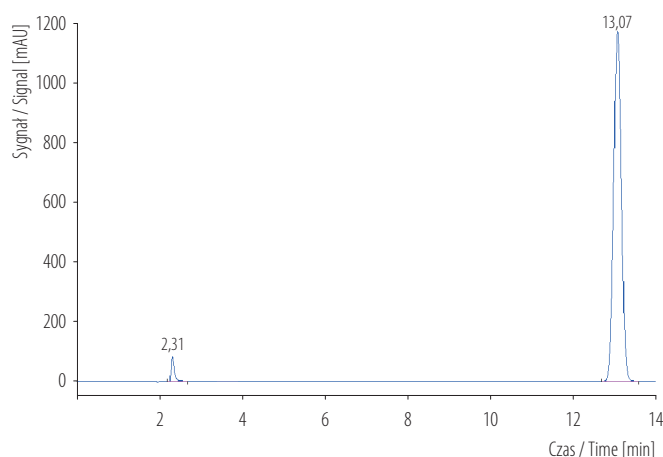
W badaniach używano następujących roztworów:

- roztwór NIT w ACN o stężeniu 5 mg/ml;
- roztwór podstawowy ADCA w DMSO o stężeniu 1 mg/ml;
- roztwory pośrednie ADCA w ACN o stężeniu 0,3 mg/ml, 0,03 mg/ml i 0,01 mg/ml uzyskane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego ADCA w ACN;
- roztwory robocze ADCA o stężeniach 0,08 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,2 µg/ml i 1,6 µg/ml przygotowane poprzez odmierzenie kolejno 0,04 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml i 0,8 ml roztworu pośredniego ADCA (o stężeniu 0,01 mg/ml) do kolb o pojemności 5 ml i uzupełnieniu do kreski ACN. Wykorzystano następujące materiały:
- filtry z włókna szklanego (klasa GF/A) o wielkości porów 0,7 µm i średnicy filtra 25 mm (Whatman, Szanghaj, Chiny),
- próbki do pobierania frakcji wdychalnej (Ekohigiena, Łódź, Polska),
- filtry strzykawkowe PTFE o średnicy porów 0,22 µm (BIOSENS, Warszawa, Polska).

Metodyka badawcza

Na podstawie właściwości fizyko-chemicznych substancji, wielkości i rodzaju zaproponowanych wartości dopuszczalnych stężeń oraz istniejących metod oznaczania ADCA w różnych mediach ustalono założenia do metody oznaczania tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy.

Do oceny narażenia zawodowego zastosowano metodę dozymetrii indywidualnej i odpowiedni próbnik do zatrzymania frakcji wdychalnej ADCA na filtrze pochłaniającym. Opracowano sposób przygotowania próbek do analizy wraz z wyznaczeniem wydajności odzysku dla układu filtr wychwytyjący substancję z dobranym rozpuszczalnikiem oraz zostały ustalone warunki przechowywania i trwałości próbek powietrza. W związku z koniecznością oznaczenia niskich stężeń ADCA w powietrzu przed oznaczaniem ilościowym niezbędne było przeprowadzenie ADCA w pochodną. Bada-



Analizę przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym przy długości fali 220 nm, z zastosowaniem kolumny Ultra C18 / The analysis was performed using high-performance liquid chromatography with diode array detection at a wavelength of 220 nm, employing an Ultra C18 column. 2,31 min – produkt reakcji 1,1'-azodi(formamid) z izotiocyanianem 1-naftyłu / 2.31 min – reaction product of azodicarbonamide with 1-naphthyl isothiocyanate; 13,07 min – izotiocyanian 1-naftyłu / 13.07 min – 1-naphthyl isothiocyanate.

Rycina 1. Chromatogram roztworu kalibracyjnego o stężeniu 0,2 µg/ml

Figure 1. Chromatogram of calibration solution with a concentration of 0.2 µg/ml

nia doświadczalne dotyczące etapu ilościowego oznaczania pochodnej ADCA polegały na wyborze techniki analitycznej odpowiedniej do oznaczanej substancji i poziomu oznaczanych stężeń. Zoptymalizowano parametry oznaczania chromatograficznego, tzn. dobrano: rodzaj kolumny chromatograficznej, warunki rozdzielania chromatograficznego, rodzaj fazy ruchomej, sposób i parametry detekcji. Przeprowadzono badania walidacyjne, m.in. wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności oraz niepewność rozszerzoną metody [22].

Ustalenie parametrów oznaczania chromatograficznego

1,1'-azodi(formamid) jest związkiem organicznym – pochodną mocznika mającą 2 grupy amidowe o strukturze $-C(=O)-N<$. Do przeprowadzenia ADCA w pochodną wybrano reakcję z NIT, który jest odczynnikiem reagującym z grupami aminowymi. Dostosowano warunki oznaczania chromatograficznego przedstawione w metodzie oznaczania produktu reakcji cyjanamidu z NIT [23] i w metodzie oznaczania N,N'-bis(2-aminoetylo)etylenodiaminy jako pochodnej z NIT [24].

Zoptymalizowane warunki oznaczania chromatograficznego produktu reakcji ADCA z NIT były następujące:

- kolumna z fazą oktadecylową Ultra C18,
- temperatura kolumny: 23°C,
- faza ruchoma (ACN:woda): 80:20,

- natężenie przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min,
- długość fali analitycznej detektora DAD: $\lambda = 220$ nm,
- objętość próbki dozowanej do aparatu: 6 µl.

Zastosowanie takich warunków pozwoliło oznaczyć produkt reakcji ADCA z NIT w obecności nadmiaru odczynnika derywatyzującego (rycina 1). Przy długości fali analitycznej wynoszącej 220 nm i innych ustalonych warunkach oznaczania ADCA nie obserwowano na chromatogramach pików pochodzących od hydrazyny i mocznika bądź od produktów ich reakcji z NIT.

Pobieranie próbek powietrza

W celu zapewnienia ilościowego wyodrębnienia ADCA z powietrza skorzystano z metody nr MDHS92/2 [21]. Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry z włókna szklanego i próbniki do pobierania frakcji wdychalnej aerozolu. Zalecany przepływ powietrza przez stosowane próbniki wynosi 2 l/min.

Podczas opracowywania metody oznaczania ADCA w powietrzu środowiska pracy przyjęto założenia umożliwiające dalsze działania. Zakres stężeń oznaczanych substancji przyjęto na poziomie 0,1–2-krotności NDS ($NDS = 0,02$ mg/m³ = 20 µg/m³) i 0,5–2-krotności NDSCh ($NDSCh = 0,04$ mg/m³ = 40 µg/m³), objętość próbki powietrza pobieranej do oceny zgodności z wartością NDS: 360 l i objętość próbki powietrza pobieranej do porównania z wartością NDSCh: 30 l.

WYNIKI

Kalibracja i powtarzalność oznaczeń

Oznaczanie kalibracyjne wykonano dla roztworów wzorcowych ADCA o stężeniach ustalonych na podstawie następujących założeń:

- zakres pomiarowy: 0,002–0,04 mg/m³,
- próbka powietrza o objętości 360 l,
- objętość rozpuszczalnika używanego do odzysku: 9 ml.

Na podstawie tych założeń przygotowano roztwór podstawowy ADCA w DMSO o stężeniu 1 mg/ml, a następnie do badań laboratoryjnych rozcieńczano ten roztwór ACN w celu uzyskania niższych stężeń.

W ustalonych warunkach oznaczania chromatograficznego analizowano 3 serie roztworów roboczych o wzrastającym stężeniu ADCA w ACN (0,08–1,6 µg/ml). Do 0,5 ml każdego roztworu dodano 20 µl roztworu NIT w ACN. Próbkę po ok. 15 min oznaczano chromatograficznie. Wykreślono krzywe wzorcowania jako zależność stężenia ADCA, w mikrogramach na mililitr, od powierzchni pików pochodnej ADCA. Otrzymano krzywą wzorcowania zapisaną w postaci równania regresji li-

Tabela 1. Parametry kalibracji oznaczania 1,1'-azodi(formamidu) jako produktu reakcji z izotiocyanianem 1-naftyli (NIT)
Table 1. Calibration parameters for determination of azodicarbonamide as reaction product with 1-naphthyl isothiocyanate (NIT)

Parametr Parameter	Oznaczenie kalibracyjne Calibration determination
Krzywa kalibracji / Calibration curve ($y = (b \pm SD)x$)	$y = (2262 \pm 55)x$
Współczynnik korelacji r / Correlation coefficient r	0,9998
Współczynnik kalibracji b / Calibration factor b ($M \pm SD$)	2188 ± 80
Wyraz wolny / Intercept ($M \pm SD$)	31 ± 28

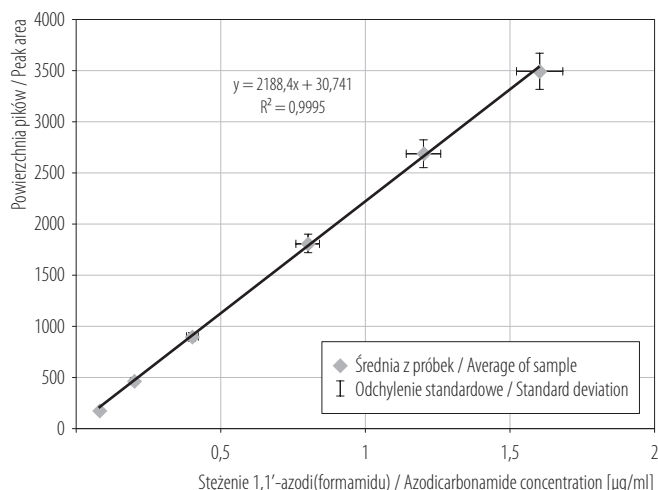
Opis metody jak w rycinie 1 / Description of a method as in Figure 1.

niowej, gdzie b jest współczynnikiem nachylenia, a a wyrazem wolnym. Liniowość krzywej wzorcowania wyrażana jest wartością współczynnika korelacji (r). Współczynnik korelacji $>0,999$ potwierdza liniowość: odpowiedź detektora DAD (przy 220 nm) była liniowa w wybranym zakresie stężeń (tabela 1, rycina 2). Ponieważ b i a są obciążone niepewnością, zbadano ich istotność. Średni wynik testu dla współczynnika nachylenia b ($t_{score} = 27,36$) został określony na podstawie średniej wartości nachylenia (b) i odchylenia standardowego i porównany z wartościami krytycznymi dla rozkładu t -Studenta przy $n-2$ stopniach swobody ($f = 4$) przy wspólnym poziomie istotności $\alpha = 0,05$ ($t_{critical} = 2,776$). Wartość $t_{score} > t_{critical}$ wskazuje, że współczynnik nachylenia był istotny. Analogicznie określono istotność punktu przecięcia linii regresji z osią y (a). Wartość t_{score} wynoszącą 1,10 obliczono na podstawie wartości a i odchylenia standardowego. Ponieważ $t_{score} < t_{critical}$ (t_j 2,776), wyraz wolny nie jest istotny.

Nachylenie krzywej kalibracyjnej wykorzystano do oszacowania granicy wykrywalności metody. Powtarzalność oznaczeń kalibracyjnych sprawdzono przez analizę 3 serii po 8 roztworów ADCA w ACN o stężeniach: 0,08 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$ i 1,6 $\mu\text{g/ml}$. Z przygotowanymi roztworami postępowano w identyczny sposób jak z tymi do wyznaczania krzywej wzorcowania. Dla każdej serii obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Współczynniki zmienności dla kolejnych serii wyniosły – odpowiednio – 4,2%, 0,54% i 0,38%, a średni współczynnik zmienności dla zakresu: 2,4%.

Badanie stopnia odzysku

Jako materiał zatrzymujący zastosowano filtry GF/A o średnicy 25 mm odpowiednie do zastosowania w prób-



Opis metody jak w rycinie 1 / Description of the method as in Figure 1.

Rycina 2. Zależność powierzchni pików od stężenia 1,1'-azodi(formamidu) w roztworach wzorcowych
Figure 2. Azodicarbonamide peak area dependence on its concentration in the standard solutions

nikach przeznaczonych do pobierania frakcji wdychalnej ADCA z powietrza.

Do badania stopnia odzysku ADCA z filtrów GF/A przygotowano 3 serie po 6 filtrów, na które naniesiono:

- po 30 μl roztworu ADCA w ACN o stężeniu 0,03 mg/ml (seria I),
- po 24 μl roztworu ADCA w ACN o stężeniu 0,3 mg/ml (seria II),
- po 48 μl roztworu ADCA w ACN o stężeniu 0,3 mg/ml (seria III).

Filtry pozostawiano do wyschnięcia. Następnie każdy zalano 9 ml ACN i wytrząsano przez 30 min. Roztwór z filtra przepuszczano przez filtr strzykawkowy PTFE. Do 0,5 ml otrzymanego przesącza dodawano 20 μl roztworu NIT w ACN. Po ok. 15 min analizowano otrzymane roztwory chromatograficznie w ustalonych warunkach. Dla każdego poziomu stężeń przygotowano po 3 roztwory porównawcze i poddano je analizie. Wyniki przedstawiono w tabeli 3. Średni współczynnik odzysku wyniósł $1,01 \pm 0,01$.

Badanie trwałości roztworów

Do badania trwałości roztworów pozostawiono w chłodziarce roztwory ADCA w ACN o stężeniach 0,08 $\mu\text{g/ml}$ i 0,8 $\mu\text{g/ml}$. W dniu badania pobierano 0,5 ml każdego roztworu i przeprowadzano reakcję ADCA z NIT. Wyniki badań trwałości roztworów po 1 dniu oraz po 5, 12 i 18 dniach przechowywania w obniżonej temperaturze oraz bez dostępu światła przedstawiono w tabeli 4.

Sprawdzono także trwałość roztworu zawierającego oznaczany produkt reakcji ADCA z NIT. Pozosta-

Tabela 2. Wyniki powtarzalności oznaczeń 1,1'-azodi(formamidu) (*azodicarbonamide* – ADCA) jako produktu reakcji z izotiocyanianem 1-naftyłu (serie pomiarowe I–III, 8 próbek)

Table 2. Results of repeatability determinations of azodicarbonamide (ADCA) as reaction product with 1-naphthyl isothiocyanate (measurement series I–III, 8 samples)

Seria Serie	Stężenie roztworu ADCA Concentration of the ADCA solution [µg/ml]	Średnia powierzchnia pików Average peak area (M±SD)	Współczynnik zmienności Coefficient of variation [%]
I	0,08	180,1±7,5	4,2
II	0,8	1811±10	0,54
III	1,6	3580±14	0,38

Opis metody jak w rycinie 1 / Description of the method as in Figure 1.

Tabela 3. Wyniki badań odzysku 1,1'-azodi(formamidu) (*azodicarbonamide* – ADCA) z filtra z włókna szklanego dla 3 stężeń z zakresu pomiarowego

Table 3. Results of azodicarbonamide (ADCA) recovery tests from glass fibre filter for 3 concentrations within the measuring range

Masa ADCA ADCA mass	Średnia powierzchnia pików Average peak area (M±SD)		Współczynnik odzysku Recovery coefficient (M±SD)	Współczynnik zmienności Coefficient of variation [%]
	w roztworach po odzysku in solution after recovery (N = 6)	w roztworach porównawczych in reference solutions (N = 3)		
0,90 µg	221,7±4,3	221,6±3,7	1,00±0,02	1,9
7,2 µg	1790±17	1767±13	1,01±0,01	0,94
14,4 µg	3436±27	3401±28	1,01±0,01	0,79

Opis metody jak w rycinie 1 / Description of the method as in Figure 1.

wiono w chłodziarce roztwór pochodnej ADCA o stężeniu 0,8 µg/ml. Wyniki badań tych roztworów po 3, 10 i 13 dniach przechowywania w obniżonej temperaturze przedstawiono w tabeli 4.

Badanie trwałości próbek

Do badania trwałości próbek powietrza przygotowano 15 filtrów z włókna szklanego z naniesionymi 24 µl roztworu 0,3 mg/ml ADCA w ACN. W dniu przygotowania próbek wykonano oznaczenie ADCA w 3 filtrach. Pozostałe filtry zabezpieczono w kasetach przed dostępem powietrza i przechowywano w temperaturze pokojowej. Wyniki badań trwałości próbek (po 3 filtry) przechowywanych przez 1 dzień oraz przez 5, 12 i 18 dni przedstawiono na rycinie 3.

Walidacja metody

Dla ustalonego sposobu pobierania próbek i przygotowania ich do analizy oraz metody analizy z zastosowaniem chromatografu cieczowego z DAD wyznaczono: zakres pomiarowy metody, współczynniki korelacji krzywych kalibracyjnych, powtarzalność, granicę wykrywalności (*limit of detection* – LOD) i granicę oznaczalności

(*limit of quantification* – LOQ) instrumentu pomiarowego oraz niepewność złożoną i rozszerzoną [22,25]. Granicę wykrywalności oraz LOQ wyznaczono na podstawie odchylenia standardowego ślepej próby i współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej. Wyznaczone odchylenie standardowe wyników powierzchni pików przy czasie retencji pochodnej z 30 pomiarów: po 10 dla 3 niezależnie przygotowanych ślepych prób, tj. próbek przygotowanych w identyczny sposób jak próbka rzeczywista, ale bez ADCA, wyniosło 0,02.

Do obliczenia wartości LOD wykorzystano zależność:

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

gdzie:

b – współczynnik nachylenia krzywej kalibracji,

s₀ – odchylenie standardowe.

Do wyliczenia LOQ podzielono 10-krotną wartość odchylenia standardowego ślepej próby przez współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej. Wyznaczone LOD i LOQ instrumentu pomiarowego wyniosły, od-

Tabela 4. Trwałość roztworów przechowywanych w chłodziarce
Table 4. Stability of solutions, stored in the freezer

Czas przechowywania Storage time	Średnie pole powierzchni pików Average peak area (M±SD)	Zmiana wyniku oznaczenia Change test results [%]
0,08 µg ADCA w 1 ml ACN / 0.08 µg ADCA in 1 ml ACN		
0 dni / days	184,23±0,42	–
1 dzień / day	188,03±0,61	2,1
5 dni / days	183,6±1,4	–0,34
12 dni / days	186,1±1,8	1,0
18 dni / days	206,6±2,1	13
0,8 µg ADCA w 1 ml ACN / 0.8 µg ADCA in 1 ml ACN		
0 dni / days	1798,6±3,8	–
1 dzień / day	1805±18	0,33
5 dni / days	1789,8±1,3	–0,50
12 dni / days	1833,8±2,2	2,0
18 dni / days	1897±16	5,5
0,8 µg pochodnej ADCA w 1 ml ACN / 0.8 µg ADCA derivate in 1 ml ACN		
0 dni / days	1805±18	–
3 dni / days	1799,57±0,62	–0,28
10 dni / days	1880,9±2,6	4,2
13 dni / days	1911,2±4,3	5,9

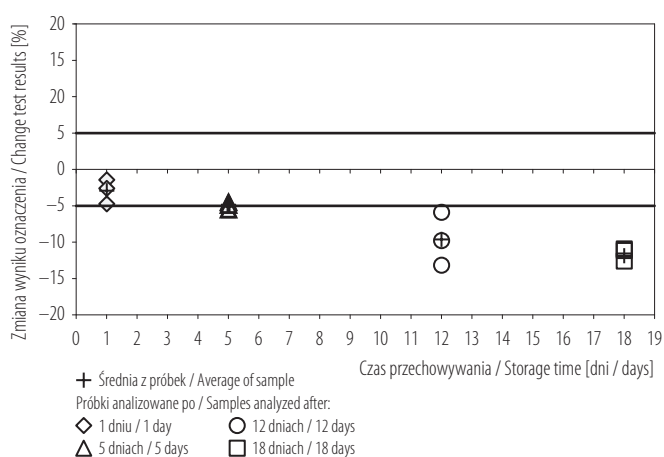
ACN – acetonitryl / acetonitrile, ADCA – 1,1'-azodi(formamid) / azodicarbonamide.
 Opis metody jak w rycinie 1 / Description of the method as in Figure 1.

powiednio, 0,03 ng/ml i 0,10 ng/ml. Uzyskane dane walidacyjne metody oznaczania ADCA dotyczą zakresu pomiarowego wynoszącego 0,08–1,6 µg/ml ADCA w roztworach kalibracyjnych.

Dla przyjętego sposobu pobierania próbek i metody oznaczania z zastosowaniem chromatografu cieczonego określono budżet niepewności pomiaru w danej metodzie. Zidentyfikowano składowe niepewności procesu pobierania próbek, tj. związane ze stabilnością aspiratora, wskazaniemi rotametrów i odczytu przepływu na rotametrze, z określeniem czasu pobierania próbki powietrza oraz z odzyskiem analitu z filtra. Niepewność złożona pobierania próbek 3-godzinnych wyniosła 9%, natomiast niepewność złożona pobierania próbek 15-minutowych – 11%.

Składowe niepewności procesu analitycznego obejmowały: niepewność przygotowania roztworu wzorcowego, rozcieńczania roztworów, naczyń pomiarowych i strzykawkę stosowanych w doświadczeniach, wyznaczenia krzywej kalibracyjnej oraz powtarzalność metody.

Po uwzględnieniu niepewności związanych ze sposobem pobierania próbek, przygotowaniem ich do ana-



Rycina 3. Trwałość próbek powietrza, zawierających po 7,2 µg 1,1'-azodi(formamidu), przechowywanych w temperaturze pokojowej

Figure 3. Stability of air samples, each containing 7,2 µg of azodicarbonamide, stored in room temperature

lize i metodą ilościowego oznaczenia oszacowano niepewność złożoną pomiaru i wyliczono niepewność rozszerzoną (dla poziomu ufności 95% i współczynnika

rozszerzenia $k = 2$) na 24% – dla próbek 3-godzinnych i 26% – dla próbek 15-minutowych.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić metodologię oznaczania frakcji wdychalnej ADCA w powietrzu na stanowiskach pracy. Potwierdzono przydatność zastosowania filtra z włókna szklanego umieszczonego w dedykowanym próbniku do pobierania frakcji wdychalnej ADCA w badanym powietrzu. Pobranie próbki powietrza o objętości 360 l pozwala wyznaczyć wskaźnik narażenia i porównać z wartością NDS z oznaczalnością równą 1/10 NDS. Do wyliczenia wskaźnika narażenia i porównania z wartością NDSCh wystarczy pobrać 30 l powietrza.

Po przepuszczeniu badanego powietrza przez próbnik (z przepływem zalecanym przez producenta próbniaka, np. 2 l/min) filtr zabezpieczony przed czynnikami zewnętrznymi można przechowywać w temperaturze pokojowej przez 5 dni. Powierzchnie pików pochodzących od oznaczanej pochodnej nie zmieniły się w tym czasie o więcej niż o 5% (rycina 3). Acetonitryl jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do wymycia zatrzymanej na filtrze substancji (średni współczynnik odzysku wyniósł $1,01 \pm 0,01$). Wyniki przedstawione w tabeli 4 wskazują, że roztwory ADCA w ACN przechowywane w chłodziarce były trwałe przez 12 dni, ponieważ zmiana powierzchni pików pochodnej ADCA z NIT była $<2\%$, natomiast po 18 dniach przechowywania roztworów w chłodziarce zmiana powierzchni pików była $>5\%$.

W związku z koniecznością oznaczenia niskich stężeń przed oznaczeniem chromatograficznym otrzymanych roztworów przeprowadzono reakcję ADCA z odczynnikiem derywatyżującym. Zastosowanie NIT pozwoliło uzyskać w krótkim czasie pochodną ADCA, która była trwała w roztworze ACN [po 10 dniach przechowywania w chłodziarce otrzymano wyniki oznaczania różniące się $<4,5\%$ (tabela 4)], oraz odpowiedź detektora DAD (przy długości fali 220 nm) była odpowiednio wysoka. Produkt reakcji ADCA z NIT ilościowo oznaczano z zastosowaniem HPLC-DAD, wykorzystując powszechnie używaną w laboratoriach środowiskowych kolumnę Ultra C18 i mieszaninę ACN z wodą jako fazę ruchomą. Krzywe kalibracyjne odpowiadające zakresowi stężeń 0,08–1,6 $\mu\text{g/ml}$ ADCA w roztworach były liniowe i charakteryzowały się bardzo dobrą powtarzalnością (średni współczynnik zmienności dla zakresu: 2,4%).

Oszacowane rozszerzone niepewności pomiaru ADCA w powietrzu (dla poziomu ufności 95%) na 24% –

dla próbek 3-godzinnych i 26% – dla próbek 15-minutowych były $<30\%$, co potwierdza, że zostało spełnione wymaganie stawiane procedurom oznaczania stężeń substancji w powietrzu na stanowiskach pracy [25] i metoda jest przydatna do zamierzonego zastosowania.

WNIOSKI

W wyniku badań opracowano prostą i czułą metodę oznaczania frakcji wdychalnej ADCA w powietrzu. Zastosowany sposób pobierania próbek do oznaczenia ADCA w powietrzu jest zgodny z regułami dozymetrii indywidualnej. Na podstawie wyników badań przyjęto także sposób przygotowania pobranych próbek i oznaczania analitycznego, które umożliwiają oznaczanie stężeń ADCA w zakresie od 1/10 do 2-krotności zaproponowanej wartości NDS. Potwierdzono przydatność metody do zamierzonego zastosowania w zakresie stężeń wymaganych dla procedur oznaczania stężeń substancji w powietrzu na stanowiskach pracy poprzez spełnienie warunku dla wielkości wyznaczonych rozszerzonych niepewności pomiaru [25]. Wartości dopuszczalne dla ADCA ustalone w Polsce oraz opracowana metoda oznaczania umożliwiają pracodawcom ocenę narażenia na ten czynnik i podjęcie odpowiednich działań prewencyjnych w przypadku przekroczeń NDS/NDSCh w celu zapewnienia bezpieczeństwa i higieny pracy pracownikom. Walidacja metody potwierdziła jej przydatność do zamierzonego zastosowania. Opracowana metoda oznaczania będzie wsparciem przedsiębiorstw w realizacji obowiązków ustawowych dotyczących bezpieczeństwa i higieny pracy.

WKŁAD AUTORÓW

Koncepcja badań: Joanna Kowalska, Małgorzata Pośniak

Metodyka badań: Joanna Kowalska

Zbieranie materiału: Joanna Kowalska

Analiza statystyczna: Joanna Kowalska

Interpretacja wyników: Joanna Kowalska,

Małgorzata Pośniak

Piśmiennictwo: Joanna Kowalska, Małgorzata Pośniak

PIŚMIENNICTWO

1. National Center for Biotechnology Information. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NCBI; 2004. Azodicarbonyl, CID 5462814 [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5462814>.
2. European Chemicals Agency. ECHA website [Internet]. Helsinki: ECHA; 2007 [cited 2025 Sep 22]. Brief Profile:

- 100.004.229. Available from: <https://echa.europa.eu/pl/brief-profile/-/briefprofile/100.004.229>.
- Institute for Occupational Safety and Health. GESTIS website [Internet]. Sankt Augustin: GESTIS; 2021 [cited 2025 Sep 22]. Azobiscarboxamide. CID 14510. Available from: <https://gestis-database.dguv.de/data?name=014510>.
 - Hartwig A. Azodicarbonamide/1,2-diazenedicarboxamide. MAK Value Documentation. The MAK Collection for Occupational Health and Safety. 2018;3(3):1034–74. <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb12377e6318>.
 - National Library of Medicine. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NLM; 2025. HSDB: Azodicarbonamide (HSDB 1097) [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/1097>.
 - Molognoni L, Daguer H, Motta GE, Merlo TC, Lindner JD. Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents. *Food Res Int.* 2019;125:108608. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108608>.
 - Ahrenholz SH, Anderson KE [red.]. Health hazard evaluation report HETA 83-156-1622 [Internet]. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health; 1985 [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB89143200.xhtml>.
 - Lieschova M, Logvinova V, Bilan M, Bohomaz A, Brygadyrenko V. Effect of azodicarbonamide on rats with a high-fat hypercaloric diet. *Acta Fytotechn Zootechn.* 2023;26(1):15–27. <https://doi.org/10.15414/afz.2023.26.01.15-27>.
 - Stadler RH, Mottier P, Guy P, Gremaud E, Varga N, Lalljie S, et al. Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars. *Analyst.* 2004;129:276–81. <https://doi.org/10.1039/B314206J>.
 - Choi KY, Lim HH, Shin HS. Development of a simultaneous analysis method of azodicarbonamide, semicarbazide, and hydrazine in flour products using HPLC. *Bull Korean Chem Soc.* 2022;43(4):585–94. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12496>.
 - Chen Z, Chen L, Lin L, Wo Y, Fu FF. A colorimetric sensor for the visual detection of azodicarbonamide in flour based on azodicarbonamide-induced anti-aggregation of gold nanoparticles. *ACS Sens.* 2018;3(10):2145–51. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00705>.
 - Ye J, Wang XH, Sang YX, Liu Q. Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: investigation of variation in flour and flour products. *J Agric Food Chem.* 2011;59(17):9313–8. <https://doi.org/10.1021/jf201819x>.
 - Wang Y, Chan W. Automated in-injector derivatization combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of semicarbazide in fish and bread samples. *J Agric Food Chem.* 2016;64(13):2802–8. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00651>.
 - Wang X, Zhao C. Non-destructive quantitative analysis of azodicarbonamide additives in wheat flour by high-throughput Raman imaging. *Pol J Food Nutr Sci.* 2021;71(4):403–10. <https://doi.org/10.31883/pjfn/142879>.
 - Li G, Tang C, Wang Y, Yang J, Wu H, Chen G, et al. A rapid and sensitive method for semicarbazide screening in foodstuffs by HPLC with fluorescence detection. *Food Anal Methods.* 2015;8:1804–11. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0063-9>.
 - Hang L, Yang H, Ji W. Determination of azodicarbonamide in flour samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with xanthidrol pre-column derivatisation. *Food Addit Contam. Part A.* 2024;1–11. <https://doi.org/10.1080/19440049.2024.2400238>.
 - Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. *DzU z 2010 r., nr 232, poz. 1525 ze zm.; DzU z 2011 r., nr 91, poz. 525*.
 - Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 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 z późniejszymi zmianami. *DzU z 2008 r., UE L 353/1*.
 - Chojnacka-Puchta L, Zapór L, Sawicka D, Miranowicz-Dzierżawska K. Działalność Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy w 2024 r. *Podst Met Ocen Środ Pracy.* 2025;123(1):109–16. <https://doi.org/10.54215/PIMOSP/6.123.2025>.
 - Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance. GESTIS International limit values for chemical agents. Azodicarbonamide [Internet]. Sankt Augustin: The Institute; 2025 [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://ilv.ifa.dguv.de/limit-values/4100>.
 - Health and Safety Executive (HSE). Methods for the Determination of Hazardous Substances (MDHS): Azodicarbonamide in air. Laboratory method with sample collection on to filters, solvent desorption and liquid chromatography [Internet]. London: Health and Safety Executive, 2014 [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.hse.gov.uk/pubns/mdhs/pdfs/mdhs92-2.pdf>.

22. Dobecki M. Walidacja metod pomiarowych i szacowanie niepewności pomiaru czynników chemicznych w powietrzu na stanowiskach pracy. *Med Pr.* 2012;63(6):723–32.
23. Jeżewska A. Cyjanamid – metoda oznaczania. *Podst Met Ocen Środ Pracy.* 2007;54(4):51–56.
24. Kowalska J. N,N'-bis(2-Aminoetylo)etylenodiamina. Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podst Met Ocen Środ Pracy.* 2016;87(1):17–29. <https://doi.org/10.5604/1231868X.1200102>.
25. Polski Komitet Normalizacyjny, PN-EN 482:2021 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężeń czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 2021.