

Joanna Kowalska

Anna Jeżewska

BADANIA NAD SKUTECZNĄ METODĄ OZNACZANIA 3,3'-DIMETYLOBENZYDYN W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

STUDIES ON AN EFFICIENT METHOD FOR DETERMINING 3,3'-DIMETHYLBENZIDINE IN THE 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: 3,3'-Dimetylobenzidyna (DMB) jest substancją zaklasyfikowaną do grupy substancji rakotwórczych. W Polsce nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia dla tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy. W związku ze stosowaniem DMB w krajowych przedsiębiorstwach zaistniała potrzeba opracowania czulej metody oznaczania 3,3'-dimetylobenzidyny w środowisku pracy. **Materiał i metody:** Metoda oznaczania polega na przepuszczaniu powietrza zawierającego DMB przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym, wymyciu osadzonej na filtrze substancji wodą i roztworem wodorotlenku sodu, ekstrakcji ciecz–ciecz z toluenem, wymianie rozpuszczalnika na acetonitryl i analizie tak otrzymanego roztworu. Badania wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (high-performance liquid chromatography – HPLC) przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Agilent Technologies seria 1200 z detektorem diodowym (diode-array detector – DAD) i detektorem fluorescencyjnym (fluorescence detector – FLD). W badaniu wykorzystano kolumnę Ultra C18 o wymiarach: 250×4,6 mm i średnicy ziaren (dp) = 5 μm (Restek). **Wyniki:** Metoda jest liniowa (r = 0,999) w zakresie stężeń wynoszących 1,08–21,6 μg/ml, co odpowiada stężeniom 2–40 μg/m³ dla próbki powietrza o objętości 540 l. Granica wykrywalności oznaczania ilościowego (limit of detection – LOD) wynosi 5,4 ng/ml, a granica oznaczalności (limit of quantification – LOQ) – 16,19 ng/ml. **Wnioski:** Opisana metoda analityczna umożliwia selektywne oznaczenie 3,3'-dimetylobenzidyny w powietrzu na stanowiskach pracy w obecności 1,4-fenylendiaminy, benzydyny, aniliny, 3,3'-dimetoksybenzydyny, 2-nitrotoluenu, 3,3'-dichlorobenzidyny i azobenzenu. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością oraz spełnia wymagania normy PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Med. Pr. 2016;67(1):43–50

Słowa kluczowe: metoda analityczna, analiza powietrza, stanowisko pracy, 3,3'-dimetylobenzidyna, czynnik rakotwórczy, chromatografia cieczowa

ABSTRACT

Background: 3,3'-Dimethylbenzidine (DMB) is a substance classified into the group of carcinogens. The value of maximum admissible concentration for this substance in the workplace air is not specified in Poland. Bearing in mind that DMB is used in domestic companies there is a need to develop a sensitive method for determining 3,3'-dimethylbenzidine in the work environment. **Material and Methods:** The method consists in passing DMB-containing air through sulfuric acid-treated glass fiber filters, washing out the substance settled on the filter, using water and solution of sodium hydroxide, liquid–liquid extraction with toluene, replacing dissolvent with acetonitrile and analyzing the obtained solution. Studies were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. An Agilent Technologies chromatograph, series 1200, with a diode-array detector (DAD) and a fluorescence detector (FLD) was used in the experiment. In the test, an Ultra C18 column of dimensions: 250×4.6 mm, particle diameter (dp) = 5 μm (Restek) was applied. **Results:** The method is linear (r = 0.999) within the investigated working range of concentration 1.08–21.6 μg/ml, which is equivalent to air concentrations 2–40 μg/m³ for a 540 l air sample. The limit of detection (LOD) of quantification determination is 5.4 ng/ml and the limit of quantification (LOQ) – 16.19 ng/ml. **Conclusions:** The analytical method described in this paper allows for selective determination of 3,3'-dimethylbenzidine in the workplace air in the presence of 1,4-phenylenediamine, benzidine, aniline, 3,3'-dimethoxybenzidine, 2-nitrotoluene, 3,3'-dichlorobenzidine and azobenzene. The method is characterized by good precision and good accuracy, it also meets the criteria for procedures involving the measurement of chemical agents, listed in EN 482:2012. Med Pr 2016;67(1):43–50

Key words: analytical method, analysis of air, workplace, 3,3'-dimethylbenzidine, carcinogen, liquid chromatography

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: 29 stycznia 2015, zatwierdzono: 28 października 2015

Finansowanie / Funding: publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach III etapu programu wieloletniego pn. „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” finansowanego w latach 2014–2016 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy. Projekt nr II.P.04 pt. „Identyfikowanie grup ryzyka związanego z narażeniem na wytypowane substancje rakotwórcze”. Kierownik projektu: dr Joanna Kowalska.

WSTĘP

Ponad 8% wszystkich chorób nowotworowych występujących w Unii Europejskiej stanowią choroby spowodowane zawodowym narażeniem na substancje rakotwórcze [1]. 3,3'-Dimetylobenzydyna (DMB) w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej WE nr 1272/2008 [2] została sklasyfikowana jako substancja rakotwórcza z przypisaną klasą zagrożenia Carc. 1B.

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 w 2012 r. na DMB i jej sole narażone były 353 osoby. W przypadku narażenia na substancje rakotwórcze skutki zdrowotne mogą występować po upływie wielu lat od narażenia.

Dla DMB nie ma w Polsce prawnie obowiązującej wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy. W Austrii wartość normatywu higienicznego dla 3,3'-dimetylobenzydyny ustalono na poziomie 0,03 mg/m³ dla pomiarów 8-godzinnych, a dla pomiarów krótkoterminowych – 0,12 mg/m³. Z kolei w Chinach jako wartość krótkoterminową ustalono 0,02 mg/m³, natomiast tę samą wartość w Ameryce – zalecaną przez Narodowy Instytut Zdrowia i Bezpieczeństwa Pracy (National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH) – przyjęto dla pomiarów wynoszących 60 min. W Kanadzie DMB znajduje się w wykazie substancji, na które narażenie powinno być kontrolowane, żeby uzyskać najniższe możliwe poziomy.

W Polsce pracodawca ma obowiązek prowadzenia rejestru prac i pracowników mogących mieć kontakt z czynnikami rakotwórczymi lub mutagennymi [3] oraz minimalizować narażenie pracowników do możliwie najniższego. Ocenę narażenia pracowników trudno jest przeprowadzić, jeśli nie ma ustalonej wartości normatywów higienicznych i dostępnych metod oznaczania substancji rakotwórczych w powietrzu na stanowiskach pracy.

3,3'-Dimetylobenzydyna występuje w postaci proszku lub kryształów barwy od białej do czerwonawej, ciemniejącej na powietrzu. Masa molowa DMB wynosi 212,29 g/mol, temperatura wrzenia – 300,5°C, temperatura topnienia – 129°C, temperatura zapłonu – 244°C, gęstość – 1,23 g/cm³, rozpuszczalność w wodzie w 25°C – 1,3 g/l, a współczynnik podziału n-oktanol/woda (log P_{ow}) – 2,34. Stosowanymi są następujące synonimy

nazwy DMB: o-tolidyna (o-tolidine), 4,4'-diamino-3,3'-diametylobifenyl (4,4'-diamino-3,3'-dimethylbiphenyl), i 4,4'-bi-o-toluidyna (4,4'-bi-o-toluidine) [4–6].

3,3'-Dimetylobenzydyna jest stosowana do wytwarzania barwników azowych do barwienia skór, tworzyw sztucznych, wyrobów tekstylnych, papieru itp., jako utwardzacz żywic poliuretanowych oraz odczynnik do wykrywania metali, tiocyjanianów, nityli i chlorków w wodzie [6,7].

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć metody oznaczania 3,3'-dimetylobenzydyny w próbkach środowiskowych (woda), płynach ustrojowych człowieka (mocz) i w barwnikach [8–10].

W metodzie analitycznej amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (Environmental Protection Agency – EPA) nr 553 [11] oznaczano zawartość DMB w próbkach wody z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (high performance liquid chromatography – HPLC) sprzężonej ze spektrometrią mas (mass spectrometry – MS). Pochodne benzydyny (w tym DMB) i pestycydy (zawierające w swojej cząsteczce atomy azotu) ekstrahowano z wody metanolem, stosując kolumnki lub dyski do ekstrakcji ciecz–ciało stałe (liquid–solid extraction – LSE) wypełnione żel krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylołą C18 lub kopolimerem: poli(styren)–diwinylobenzen. W ten sposób wyekstrahowane substancje rozdzielano, stosując kolumnę chromatograficzną wypełnioną żel krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylołą C18, a jako fazę ruchomą stosowano acetonitryl i wodę (50:50, v/v). Granica wykrywalności DMB tą metodą wynosi 7,1 µg/l.

Identyfikację rakotwórczych amin aromatycznych uwalnianych z barwników azowych (w tym DMB) w tekstyliach można przeprowadzić w oparciu o metody analityczne zawarte w normie PN-EN 14362-1: 2012 [12]. Aminy wyizolowane z próbki włókienniczej są oznaczane z zastosowaniem metod chromatograficznych: HPLC lub chromatografii gazowej (gas chromatography – GC). W celu rozdzielania amin metodą HPLC z detektorem diodowym (diode-array detector – DAD) zaleca się kolumnę Zorbax Eclipse XDB C18 (o wymiarach 150×4,6 mm; średnicy ziaren (dp) = 3,5 µm) z fazą ruchomą programowaną, w której skład wchodzi metanol i bufor fosforanowy. Temperatura kolumny wynosi 32°C. Długości fali analitycznej, przy których można prowadzić oznaczanie, to 240 nm, 280 nm, 305 nm i 380 nm. Przy przeprowadzaniu analizy z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (gas chromatography mass spec-

trometry – GC-MS) zaleca się stosowanie kolumny kapilarnej DB-35MS (35 m × 0,25 mm × 0,25 μm) w temperaturze programowanej wynoszącej 100–310°C.

Do oznaczania DMB w powietrzu środowiska pracy przeznaczone są dwie amerykańskie metody – metoda NIOSH nr 5013 [13] i metoda Ministerstwa Bezpieczeństwa Zawodowego i Zdrowia (Occupational Safety nad Health Administration – OSHA) nr 71 [14]. Korzystając z metody NIOSH, w próbkach powietrza oprócz DMB można oznaczyć benzydynę i 3,3'-dimetoksybenzydynę. Metoda polega na adsorpcji substancji na filtr teflonowy, ekstrakcji wodą i chromatograficznym oznaczeniu tak uzyskanego roztworu.

W metodzie OSHA [14] powietrze zawierające DMB pobierano na filtry z naniesionym kwasem siarkowym. Zaadsorbowaną substancję wymywno z filtra wodą. Pochodną uzyskaną po przekształceniu bezwodnikiem kwasu heptafluorobutyrowego oznaczano z zastosowaniem chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów (electron capture detector – ECD). Granica wykrywalności 3,3'-dimetylobenzydyny metodą OSHA wynosi 11 ng/m³.

Celem niniejszej publikacji jest przedstawienie nowej metody analitycznej, która umożliwi oznaczenie DMB o niskim poziomie stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy produkcji Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem diodowym (diode array detector – DAD) oraz fluorymetrycznym (fluorescence detector – FLD), 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). Wykorzystano również kolumnę chromatograficzną wypełnioną żelom krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową Ultra C18 o wymiarach: 250×4,6 mm i dp = 5 μm, z przedkolumną o wymiarach: 10×4 mm (prod. Restek, USA).

Do pobierania próbek powietrza zawierających 3,3'-dimetylobenzydynę wykorzystano aspirator GilAir 5 (prod. Sensidyne, USA). Do przeprowadzenia desorpcji analitów z filtrów zastosowano wytrząsarkę mechaniczną WL-2000 (prod. JWElectronic, Polska). Wzorce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (prod. Sartorius Corporation, USA).

Próbki przechowywano w eksykatorze szafkowym (prod. WSL, Polska).

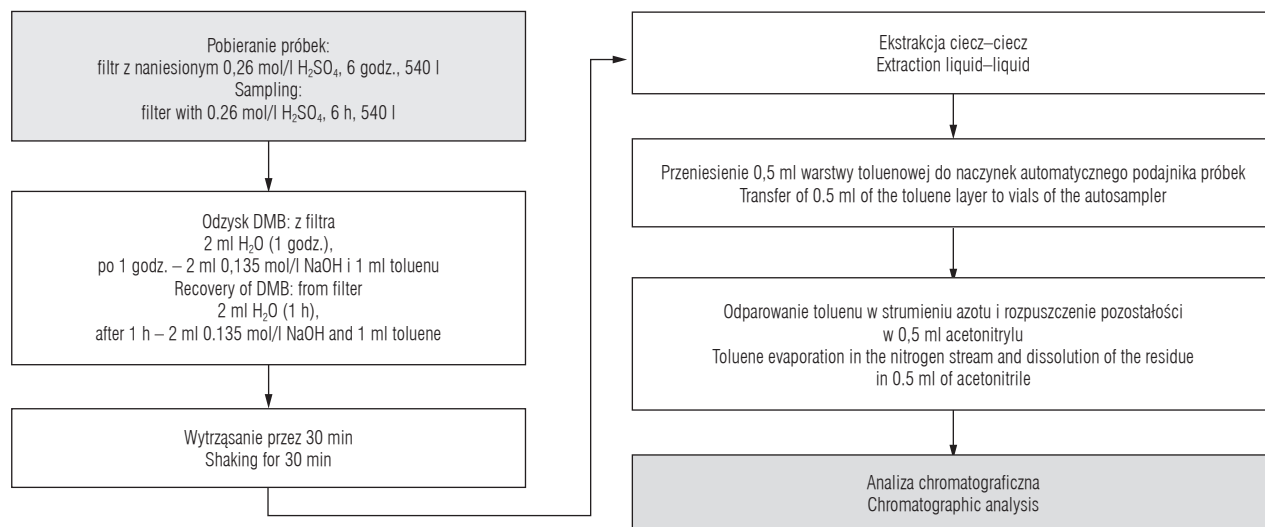
W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: 3,3'-dimetylobenzydynę (prod. Sigma-Aldrich, USA), 3,3'-dimetoksybenzydynę, benzydynę (prod. Fluka, Szwajcaria), 3,3'-dichlorobenzydynę (prod. Supelco, USA), anilinę, acetonitryl (prod. Merck, Niemcy), toluen (prod. JT Baker, Holandia), kwas siarkowy(VI) o stężeniu 25% (v/v), kwas ortofosforowy(V) o stężeniu 85% (v/v), wodorofosforan sodu bezwodny (prod. Polskie Odczynniki Chemiczne, 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).

Jako materiałów do pobierania próbek powietrza używano filtrów z włókna szklanego o średnicy 37 mm (prod. Whatman, Anglia).

Warunki pobierania próbek i analizy

Próbki powietrza zawierającego 3,3'-dimetylobenzydynę (540 l) pobierano na 2 filtry z naniesionym kwasem siarkowym, umieszczone w oprawkach i połączone szeregowo zgodnie z metodą OSHA [14]. Po pobieraniu próbki powietrza filtry przenoszono do kolb stożkowych. Do odzysku osadzonego na filtrze disiarczaniu DMB stosowano 2 ml wody destylowanej, a filtry w kolbach pozostawiano na około 1 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodawano 2 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,135 mol/l i 1 ml toluenu. Kolby wytrząsano przez 30 min. Roztwory znad filtra przenoszono do probówek i pozostawiano w spoczynku aż do osiągnięcia stanu równowagi między fazą wodną a toluenową. Następnie pobierano 0,5 ml warstwy toluenowej i przenoszono do naczynek o pojemności 2 ml. Zawartość naczynek odparowywano w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml acetonitrylu. Tak uzyskany roztwór oznaczano chromatograficznie (HPLC). Schemat przygotowania próbki do analizy przedstawiono na rycinie 1.

Oznaczenie prowadzono, stosując kolumnę do HPLC typu Ultra C18 z przedkolumną. Temperatura kolumny wynosiła 40°C, a natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej – 1 ml/min. Jako fazę ruchomą stosowano acetonitryl: bufor fosforanowy (0,05 mol/l Na₂HPO₄ – H₃PO₄, pH = 7) (50:50, v/v). Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 μl. Do detekcji wykorzystano detektor FLD. Długość fali wzbudzenia (λ_{ex}) wynosiła 276 nm, a emisji (λ_{em}) – 400 nm. Takie warunki

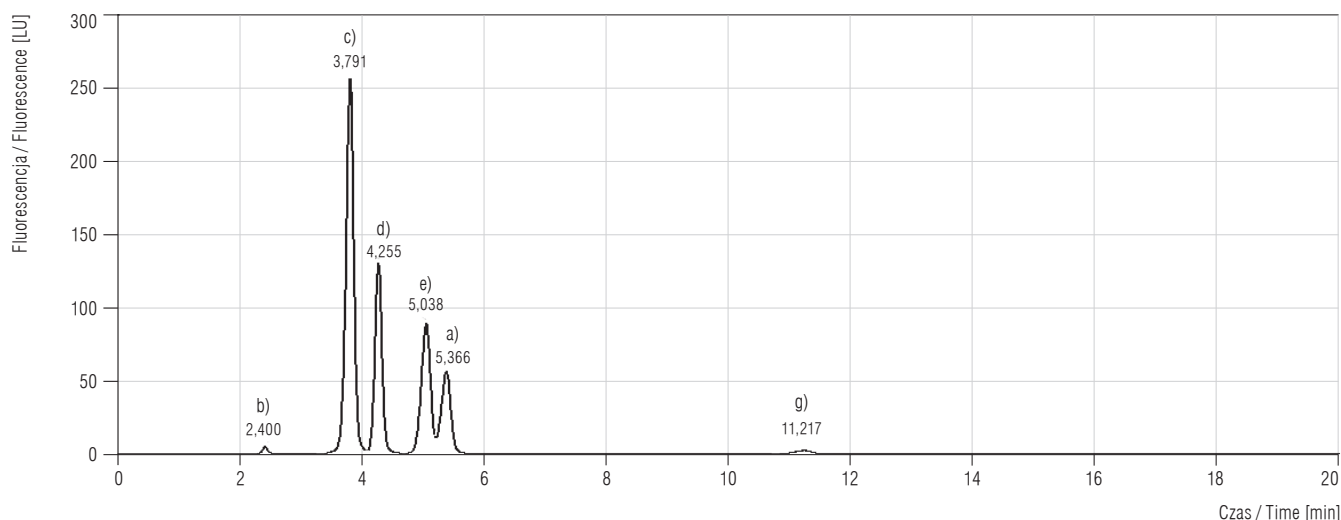


Ryc. 1. Przygotowanie próbek powietrza do analizy chromatograficznej
Fig. 1. Preparation of the air sample for chromatographic analysis

umożliwiły oznaczenie DMB w obecności innych substancji chemicznych (ryc. 2):

- 1,4-fenylenodiaminy, benzydiny, aniliny, 3,3'-dimetoksybenzydiny i 3,3'-dichlorobenzydiny – które są źródłem fluorescencji przy ww. długościach fali wzbudzenia i emisji,
- 2-nitrotoluenu i azobenzenu – które w tych warunkach nie wywołują takiego zjawiska.

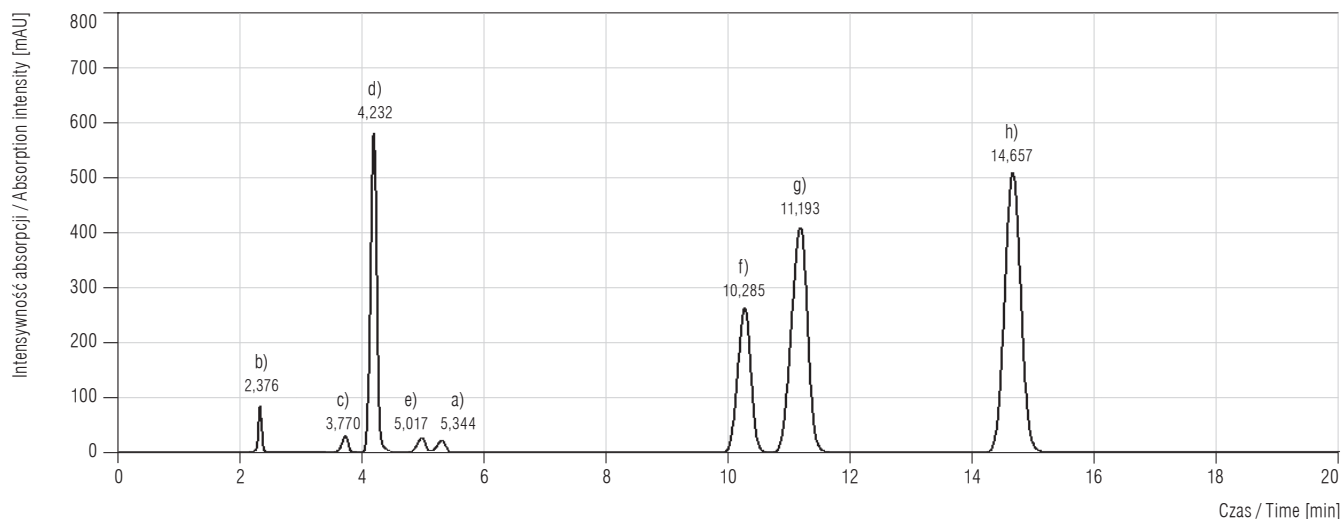
Ustalono także warunki oznaczania DMB z zastosowaniem detektora diodowego, przy długości fali analitycznej (λ) wynoszącej 210 nm (ryc. 3). Zastosowanie detektora FLD w porównaniu z detektorem DAD umożliwiło oznaczenie 100-krotnie niższego stężenia DMB, dlatego dalsze badania prowadzono z wykorzystaniem tylko detektora FLD.



Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD): długość fali wzbudzenia (λ_{ex}) = 276 nm i emisji (λ_{em}) = 400 nm / High performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD): length of excitation wave (λ_{ex}) = 276 nm and emission wave (λ_{em}) = 400 nm.

Ryc. 2. HPLC-FLD – chromatogram roztworu wzorcowego a) 3,3'-dimetylobenzidyny (DMB) (o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$) w obecności: b) 1,4-fenylenodiaminy, c) benzydiny, d) aniliny, e) 3,3'-dimetoksybenzydiny, f) 2-nitrotoluenu (bez pików), g) 3,3'-dichlorobenzydiny i h) azobenzenu (bez pików)

Fig. 2. HPLC-FLD – chromatogram of standard solution of a) 3,3'-dimethylbenzidine (DMB) (with concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of: b) 1,4-phenylenediamine, c) benzidine, d) aniline, e) 3,3'-dimethoxybenzidine, f) 2-nitrotoluene (without peak), g) 3,3'-dichlorobenzidine and h) azobenzene (without peak)



Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym (HPLC-DAD): długość fali analitycznej (λ) = 210 nm / High performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD): length of analytical wave (λ) = 210 nm.

Ryc. 3. HPLC-DAD – chromatogram roztworu wzorcowego a) 3,3'-dimetylobenzyny (DMB) (o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$) w obecności: b) 1,4-fenylendiaminy, c) benzyny, d) aniliny, e) 3,3'-dimetoksybenzyny, f) 2-nitrotoluenu, g) 3,3'-dichlorobenzyny i h) azobenzenu

Fig. 3. HPLC-DAD – chromatogram of standard solution of a) 3,3'-dimethylbenzidine (DMB) (with concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of: b) 1,4-phenylenediamine, c) benzidine, d) aniline, e) 3,3'-dimethoxybenzidine, f) 2-nitrotoluene, g) 3,3'-dichlorobenzidine and h) azobenzene

WYNIKI I OMÓWIENIE

W celu sprawdzenia warunków pobierania próbek powietrza metodą OSHA nr 71 [15] na filtr z włókna szklanego pokryty kwasem siarkowym(VI) naniesiono 54 μg DMB. Filtr ten po wyschnięciu umieszczono w oprawce jako pierwszy, natomiast jako drugi – czysty filtr, tzw. zabezpieczający. Przez układ – składający się z połączonych szeregowo i umieszczonych w oprawce filtrów oraz pompy ssącej o regulowanym i kontrolowanym za pomocą rotametu strumieniu objętości

powietrza – przepuszczono 540 l powietrza ze strumieniem objętości 180 l/godz. i 90 l/godz. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

W dalszych badaniach pobierania próbek powietrza używano tylko strumienia objętości 90 l/godz., ponieważ przy tak prowadzonym procesie pobierania próbek powietrza na drugim filtrze nie obserwowano obecności DMB.

Na podstawie uzyskanych wyników badań ustalono sposób pobierania próbek powietrza zawierającego DMB – przez 2 połączone szeregowo filtry o śred-

Tabela 1. Wpływ przepuszczania 540 l powietrza przez próbnik na odzysk 3,3'-dimetylobenzyny (DMB)
Table 1. Effect of passing 540 l of air through the probe for 3,3'-dimethylbenzidine (DMB) recovery

Strumień objętości powietrza [l/godz.] Air flow rate [l/h]	Czas [godz.] Time [h]	Powierzchnia pików DMB w roztworach po odzysku (wg wskazań oprogramowania ChemStation) Peak area of DMB in solutions after recovery (according to the indications of ChemStation software)		Zawartość substancji osadzonej na filtrze II (w ilości oznaczonej w filtrze I) Content of substance settled on filter II (in amount determined on filter I) [%]
		filtr I filter I	filtr II filter II	
180	3	3 625,9	3,0	0,08
180	3	3 659,3	1,2	0,03
90	6	3 586,2	n.w.	0,00
90	6	36 002,0	n.w.	0,00

n.w. – nie wykryto / not detected.

nicy 37 mm z naniesionym kwasem siarkowym przepuszcza się 540 l badanego powietrza ze strumieniem objętości nie większym niż 180 l/godz. Taki sposób postępowania umożliwia pobieranie 1 próbki powietrza przez 6 godz. w strefie oddychania pracownika, a więc zgodnie z zasadami dozymetrii indywidualnej [15]. Stosując metodę dozymetrii indywidualnej, uzyskuje się najbardziej wiarygodne wyniki oceny narażenia zawodowego.

Kalibracja

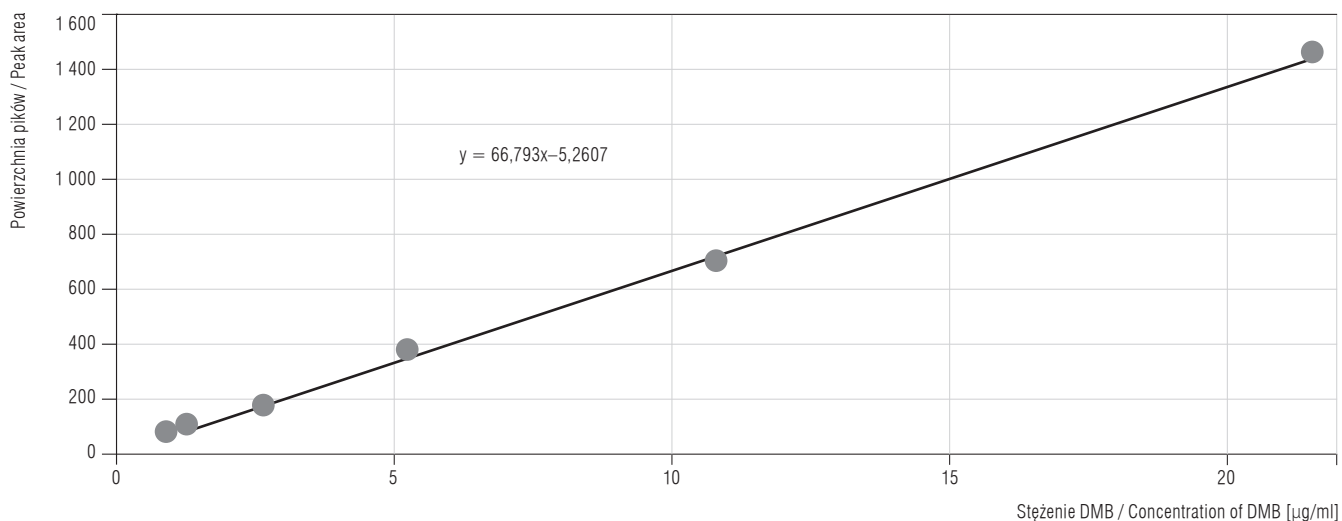
Oznaczanie kalibracyjne wykonywano z roztworów uzyskanych po odzysku analitu z filtrów, na które uprzednio naniesiono po 50 µl roztworów wzorcowych roboczych DMB w acetonitrylu o stężeniach: 21,6 µg/ml,

27 µg/ml, 54 µg/ml, 108 µg/ml, 216 µg/ml i 432 µg/ml. Kalibrację przeprowadzono w 3 seriach. Roztwory uzyskane po wyschnięciu filtrów i przygotowaniu próbek do analizy oznaczano chromatograficznie. Uzyskane parametry krzywych kalibracji dla 3 serii pomiarowych przedstawiono w tabeli 2.

Przykładową krzywą kalibracji w zakresie stężeń od 1,08 µg/ml do 21,6 µg/ml – czyli zależność powierzchni pików od stężenia DMB w roztworach uzyskanych z ekstrakcji filtrów – przedstawiono na rysunku 4. Współczynnik nachylenia „b” krzywej kalibracji (ryc. 4) o równaniu $y = bx + a$, charakteryzujący czułość metody, wynosi 66,79. Liniowość krzywej wzorcowej charakteryzowana wartością współczynnika korelacji (r) wynosi 0,9999.

Tabela 2. Parametry kalibracji dla 3 serii pomiarowych
Table 2. Calibration parameters for the 3 series of measurements

Parametr Parameter	Seria pomiarowa Measurement series		
	I	II	III
Krzywa kalibracji / Calibration curve ($y = bx + a$)	$y = 73,08x + 9,99$	$y = 62,08x - 8,3$	$y = 65,22x - 17,48$
Współczynnik korelacji / Correlation coefficient (r)	0,9995	0,9997	0,9993
Średnia (serie I–III) / Mean (series I–III)			
współczynnik kalibracji / calibration factor		64,61	
odchylenie standardowe współczynnika kalibracji / standard deviation of the calibration factor		2,66	
współczynnik zmienności współczynnika kalibracji / coefficient of variation of the calibration factor [%]		4,12	



Ryc. 4. Zależność powierzchni pików od stężenia 3,3'-dimetylobenzidyny (DMB) w roztworach uzyskanych po ekstrakcji z filtrów
Fig. 4. Dependence of peak area on 3,3'-dimethylbenzidine (DMB) concentration in solutions obtained after extraction from filter

Precyzja

Ocenę precyzji oznaczeń kalibracyjnych wykonano dla 3 serii (po 8 roztworów każda) o stężeniach: 1,08 µg/ml, 10,8 µg/ml i 21,6 µg/ml. Z każdego roztworu wykonano po 2 pomiary chromatograficzne w warunkach identycznych jak przy wykonaniu oznaczeń kalibracyjnych. Z danych uzyskanych z chromatogramów obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (tab. 3). Całkowita precyzja badania wynosi 5,26%.

Walidacja

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z europejską normą PN-EN 482:2012 [16].

Do obliczenia wartości granicy wykrywalności (LOD) wykorzystano zależność:

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

gdzie:

b – współczynnik nachylenia krzywej kalibracji,

s₀ – odchylenie standardowe.

W celu obliczenia odchylenia standardowego wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych przeprowadzono 10 niezależnych pomiarów powierzchni piku przy czasie retencji badanego analitu dla 3 niezależnie przygotowanych ślepych prób (próbka przygotowana w identyczny sposób jak próbka rzeczywista, bez analitu).

Dane walidacyjne uzyskane na podstawie wyników przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 4.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań wytypowano sorbent (filtr z naniesionym kwasem siarkowym) do pochłaniania 3,3'-dimetylobenzydyny z powietrza. Pobrane próbki są trwałe przez co najmniej 7 dni. Zaproponowano sporządzanie krzywej wzorcowej z uwzględnieniem w niej etapu przygotowania próbki do analizy. W badanym zakresie (1,08–21,6 µg/ml) krzywa wzorcowa jest liniowa. Taki sposób prowadzenia analizy skraca czas jej trwania i zmniejsza zużycie odczynników. Przedstawiona metoda może być wykorzystana

Tabela 3. Parametry charakteryzujące precyzję oznaczeń chromatograficznych

Table 3. Parameters characterizing the precision of chromatographic determination

Parametr Parameter	Seria pomiarowa Measurement series		
	I	II	III
Stężenie roztworu / Concentration of the solution [µg/ml]	1,08	10,80	21,60
Średnia powierzchnia piku / Average value of peak area	74,57	776,08	1638,33
Odchylenie standardowe / Standard deviation	1,25	13,72	24,26
Współczynnik zmienności / Coefficient of variation [%]	1,68	1,77	1,48

Tabela 4. Dane walidacyjne metody analitycznej oznaczania 3,3'-dimetylobenzydyny (DMB)

Table 4. Validation data of the analytical method for determining 3,3'-dimethylbenzidine (DMB)

Parametr Parameter	Wartość Value
Zakres pomiarowy / Measurement range [µg/m ³]	2–40
Powietrze pobrane do analizy / Air sampled for analysis [l]	540
Zakres krzywej wzorcowej / Calibration curve, range [µg/ml]	1,08–21,60
Granica wykrywalności / Limit of detection (LOD) [ng/ml]	5,40
Granica oznaczalności / Limit of quantification (LOQ) [ng/ml]	16,19
Całkowita precyzja badania / Overall precision of the examination [%]	5,26
Względna niepewność całkowita / Relative total uncertainty [%]	11,53

do oznaczania stężeń 3,3'-dimetylobenzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy. Badania ilościowe DMB w powietrzu na stanowisku pracy z zastosowaniem przedstawionej metody oznaczania umożliwią ocenę zawodowego narażenia pracowników na tę substancję.

PIŚMIENNICTWO

1. Skowroń J.: Czynniki rakotwórcze i mutagenne w świetle ustawodawstwa polskiego i Unii Europejskiej. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* 2007;54:5–44
2. 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 (tekst mający znaczenie dla Europejskiego Obszaru Gospodarczego). *DzU UE z 2008 r., L 353*
3. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 24 lipca 2012 r. w sprawie substancji chemicznych, ich mieszanin, czynników lub procesów technologicznych o działaniu rakotwórczym lub mutagennym w środowisku pracy. *DzU z 2012 r., poz. 890*
4. Sapota A., Darago A., Szymczak W.: 3,3'-Dimetylobenzydyna i jej sole. *Wyt. Szac. Ryzyka Zdr. Czyn. Rak.* 2006;1:41–60
5. Pohanish R.P.: *Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens*. Wyd. 6. Elsevier Inc., Waltham (Massachusetts) 2012
6. GESTIS Substance database [Internet]: BG Institute for Occupational Safety and Health, Sankt Augustin. 3,3'-Dimethylbenzidine [cytowany 4 stycznia 2014]. Adres: <http://gestis-en.itrust.de>
7. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program: 13th report on carcinogens. Department, Public Health Service, Research Triangle Park, North Carolina 2014
8. Shelke M., Sanghi S.K., Asthana A., Lamba S., Sharma M.: Fast separation and sensitive detection of carcinogenic aromatic amines by reversed-phase μ -liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 2005;1089:52–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.029>
9. Sutthivaiyakit P., Achatz S., Lintelmann J., Aungpradit T., Chanwirat R., Chumanee S. i wsp.: LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;381:268–276, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2852-2>
10. Sparr Eskilsson C., Davidsson R., Mathiassonet L.: Harmful azo colorants in leather Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques. *J. Chromatogr. A.* 2002;955:215–227, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00323-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00323-0)
11. Behymer T.D., Bellar T.A., Ho J.S., Budde W.L.: EPA Method 553. Determination of benzidines and nitrogen-containing pesticides in water by liquid-liquid extraction or liquid-solid extraction and reverse phase high performance liquid chromatography/particle beam/mass spectrometry. Revision 1.1. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati (Ohio) 1992
12. PN-EN 14362-1:2012. Textiles. Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants. Detection of the use of certain azo colorants accessible with and without extracting the fibres. *Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2012*
13. The National Institute for Occupational Safety and Health: Dyes, benzidine-, o-tolidine-, o-dianisidine. Method No 5013. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) [Internet]: NIOSH 1994 [cytowany 4 stycznia 2014]. Adres: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5013.pdf>
14. Occupational Safety and Health Administration [Internet]: U.S. Department of Labor, Salt Lake City [cytowany 4 stycznia 2014]. o-Dianisidine, 4,4'-Methylenbis(2-chloroaniline), o-Tolidine. Method No. 71. Adres: <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org071/org071.html>
15. PN-Z-04008-7:2002. Air purity protection. Sampling methods. Principles of air sampling in work place and interpretation of results. *Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002*
16. PN-EN 482:2012. Workplace exposure. General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents. *Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2012*