

But-2-enal

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

But-2-enal

Determination in workplace air

dr inż. ANNA JEŻEWSKA
<https://orcid.org/0000-0002-8765-4079>
e-mail: anjez@ciop.pl
inż. AGNIESZKA WOŹNICA
<https://orcid.org/0000-0001-5335-5970>
e-mail: agwoz@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS: 4170-30-3

Słowa kluczowe: aldehyd krotonowy, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Keywords: crotonaldehyde, determination method, liquid chromatography, workplace air, health sciences, environmental engineering.

Streszczenie

But-2-enal (aldehyd krotonowy) jest bezbarwną cieczą o nieprzyjemnym, duszącym zapachu. But-2-enal występuje naturalnie w żywności. Związek stosuje się głównie do produkcji kwasu sorbowego – substancji konserwującej żywność. But-2-enal jest substancją bardzo toksyczną, silnie drażniącą i uczulającą. Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.

Celem pracy było opracowanie metody oznaczania but-2-enalu, która umożliwi oznaczanie jego stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy, w zakresie od 1/10 do 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS).

Badania wykonano, stosując chromatograf cieczowy (HPLC) z detektorem diodowym (DAD), wyposażony w kolumnę Ultra C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm).

Opracowana metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w powietrzu but-2-enalu na żelu krzemionkowym z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną (2,4-DNFH), desorpcji 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu acetonitrylem i chromatograficznym oznaczaniu tak uzyskanego roztworu.

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Metoda umożliwia oznaczanie but-2-enalu w zakresie stężeń 0,1 ÷ 2 mg/m³ dla próbki powietrza o objętości 12 l. Uzyskano następujące parametry walidacyjne:

- granica wykrywalności, LOD 1,26 ng/ml (0,21 µg/m³),
- granica oznaczalności, LOQ 3,77 ng/ml (0,63 µg/m³),
- całkowita precyzja badania 5,08%,
- niepewność rozszerzona 22%.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach IV etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, dofinansowanego w latach 2017-2019 w zakresie zadań służb państwowych przez Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej.

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

Opracowana metoda analityczna umożliwia selektywne oznaczanie but-2-enalu w powietrzu na stanowiskach pracy o stężeniach od 0,1 mg/m³, czyli od 1/10 wartości NDS w obecności substancji współwystępujących. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN 482 dla procedur oznaczania czynników chemicznych.

Opracowana metoda oznaczania but-2-enalu została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

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

Summary

But-2-enal (crotonaldehyde) is a colourless liquid with an unpleasant suffocating odour. But-2-enal occurs naturally in food. It is mainly used for the production of sorbic acid, a food preservative. But-2-enal is a very toxic, highly irritating and allergenic substance – it is suspected of causing genetic defects. The aim of the study was to develop a method for determination of but-2-enal, which will enable determination of concentrations of this substance in the workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values. The tests were performed using a liquid chromatograph (HPLC) with a diode array detector (DAD), equipped with an Ultra C18 column (250 × 4.6 mm; 5 μm). The method consists in retaining the but-2-enal on a silica gel coated with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The sample is extracted with acetonitrile and analyzed by HPLC. Validation of the method was carried out in accordance with the requirements of the European standard EN 482. The measuring range of the method is from 0.1 to

2 mg/m³ for a 12 l sample of air. The following validation parameters were obtained: limit of detection: 1.26 ng/ml (0.21 μg/m³), limit of quantification: 3.77 ng/ml (0.63 μg/m³), the overall accuracy of the method: 5.08%, expanded uncertainty: 22%. The developed analytical method enables selective determination of but-2-enal in workplace air at concentrations ranging from 0.1 mg/m³, i.e. from 1/10 of the MAC value in the presence of co-occurring substances. The method is characterized by good precision and accuracy and meets the requirements of the European standard PN-EN 482 for procedures for determination of chemical agents. The developed method of determining but-2-enal has been recorded as an analytical procedure (see Appendix). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

WPROWADZENIE

But-2-enal (aldehid krotonowy) jest bezbarwną cieczą o nieprzyjemnym, duszącym zapachu, ciemniejącą pod wpływem światła. Próg wyczuwalności zapachu wynosi od 0,2 do 0,6 mg/m³ (CHEMPYŁ 2018). But-2-enal jest dobrze rozpuszczalny w: wodzie, etanolu, eterze dietylowym i benzenie, natomiast nie rozpuszcza się w acetonie i dimetylosulfotlenku. Jego pary są cięższe od powietrza (mogą przemieszczać się wzdłuż podłoża) i tworzą mieszaniny wybuchowe z powietrzem (możliwy zapłon w odległych punktach). Stwarza ryzyko wybuchu w kontakcie z: kwasami, zasadami i buta-1,3-dienem. Może niebezpiecznie reagować z utleniaczami (CHEMPYŁ 2018; GESTIS 2018; *Harbison* i in. 2015; IPCS 2017). Masa molowa but-2-enalu wynosi 70,09 g/mol, temperatura wrzenia 102,4 °C (101 kPa), temperatura topnienia -76,6 °C, temperatura zapłonu 13 °C, prężność par w temperaturze 20 °C wynosi 31 ÷ 40 hPa w zależności od źródła, z którego pochodzą informacje (CHEMPYŁ 2018; GESTIS 2018; IARC 1995). But-2-enal (CAS:

4170-30-3) może tworzyć izomery: *E* (*trans*) CAS: 123-73-9 i *Z* (*cis*) CAS: 15798-64-8. Znaczenie przemysłowe ma tylko izomer *E*, z którego jest wytwarzany: kwas (*E*)-heksa-2,4-dienowy (inaczej kwas sorbowy – substancja konserwująca: żywność, kosmetyki i środki farmaceutyczne), kwas krotonowy oraz 3-metylobutan-1-ol. Dawniej but-2-enal był stosowany do wytwarzania: barwników, środków uspokajających, pestycydów i środków smakowo-zapachowych. Związek był używany w przemyśle gumowym i branży tworzyw sztucznych. W latach 2013-2014 w Polsce nie było pracowników narażonych na działanie (*E*)-but-2-enalu o stężeniach przekraczających 0,1 wówczas obowiązującej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), tj. 0,6 mg/m³ (*Kilanowicz* in. 2017).

But-2-enal otrzymywany jest w dwuetapowym procesie, rozpoczynającym się kondensacją aldolową aldehydu octowego pod wpływem zasad do β-hydroksyaldehydu, który łatwo ulega dehydratacji w środowisku kwaśnym. W wyniku tej reakcji

powstaje praktycznie czysty (*E*)-but-2-enal.

(*E*)-But-2-enal jest substancją: bardzo toksyczną, silnie drażniącą i uczulającą. Skażenie skóry powoduje jej zaczerwienienie, ból, może nastąpić chemiczne oparzenie. Skażenie oczu ciekłą substancją wywołuje łzawienie i ból oczu, z oparzeniem rogówki. Objawy zatrucia ostrego but-2-enalem (w postaci par o stężeniu ok. 30 mg/m³) pojawiają się po około 10 minutach od zatrucia. Wówczas występują takie objawy, jak: ból, obfite łzawienie oczu, zaczerwienienie spojówek, kaszel, uczucie ucisku w klatce piersiowej, duszność. Pary o bardzo dużym stężeniu mogą wywołać obrzęk płuc. W wyniku zatrucia przewlekłego (ekspozycja inhalacyjna) ułatwia pojawienie się infekcji układu oddechowego. Powtarzający się kontakt ze skórą może wywołać zmiany uczuleniowe i/lub zapalne (CHEMPYL 2018). (*E*)-But-2-enal ma przypisane następujące zwroty określające rodzaj zagrożenia (WE nr 1272/2008):

- H225: wysoce łatwopalna ciecz i pary,
- H301: działa toksycznie po połknięciu,
- H311: działa toksycznie w kontakcie ze skórą,
- H330: wdychanie grozi śmiercią,
- H315: działa drażniąco na skórę,
- H318: powoduje poważne uszkodzenie oczu,
- H335: może powodować podrażnienie dróg oddechowych,
- H341: podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne,
- H373: może powodować uszkodzenie narządów przez długotrwałe lub wielokrotne narażenie,
- H400: działa bardzo toksycznie na organizmy wodne.

Brak informacji na temat zagrożeń powodowanych przez (*Z*)-but-2-enal (ECHA 2018). But-2-enal nie został sklasyfikowany jako rakotwórczy dla ludzi (IARC 1995).

Obowiązująca do połowy 2018 roku wartość normatywu higienicznego – najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) w powietrzu na stanowiskach pracy – dla (*E*)-but-2-enalu wynosiła 6 mg/m³, a najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) – 12 mg/m³ (Obwieszczenie... 2017). W nowym rozporządzeniu wprowadzono zapis, odnoszący się do mieszaniny izomerów but-2-enalu, ustalając nowe wartości wynoszące: NDS = 1 mg/m³ i NDSCh = 2 mg/m³ (Rozporządzenie... 2018). Z tego powodu powstała konieczność opracowania nowej metody oznaczania but-2-enalu przystosowanej do nowych, obniżonych wartości normatywów higienicznych (Kilanowicz i in. 2017).

Aldehydy, w tym także but-2-enal, oznaczano zarówno z zastosowaniem chromatografii gazowej, jak i wysokosprawnej chromatografii ciekłowej (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS) jako techniki analitycznej. W metodzie opisanej w OSHA but-2-enal oznaczano po uprzednim przeprowadzeniu go w pochodną z zastosowaniem HPLC/UV-VIS. Badane powietrze (6 l) przepuszczano przez filtry z włókna szklanego (o średnicy 37 mm) z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną (2,4-DNFH). Powstały na filtrze 2,4-dinitrofenylohydrazyn but-2-enal wymywano z filtrów acetonitrylem (3 ml) i oznaczano chromatograficznie (Hendricks 1990). W metodzie podano, że w powietrzu należy się spodziewać tylko (*E*)-but-2-enalu. Granica oznaczalności metody wynosi 93 µg/m³.

W metodzie opisanej w NIOSH aldehydy, w tym but-2-enal, oznaczano z zastosowaniem chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) lub chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas (GC-MS), (Grote, Kennedy 1994). Próbkę powietrza (5 l) zawierającego aldehydy pobierano na rurki szklane wypełnione żywicą XAD-2 z naniesioną 2-(hydroksymetylo)piperydyną. Do desorpcji stosowano toluen (1 ml). Uzyskane roztwory analizowano chromatograficznie, stosując kolumnę DB-1301 o temperaturze programowanej. Granica oznaczalności metody wynosi 2 µg aldehydu w próbce. W metodzie umieszczono uwagę, że takie aldehydy, jak: propanal, 2-metylopropanal (izobutyroaldehyd) i but-2-enal bardzo wolno reagują z 2-(hydroksymetylo)piperydyną i brak ich w próbce, nie oznacza braku tych substancji w badanym powietrzu.

W drugiej metodzie NIOSH próbki powietrza, zawierającego but-2-enal, pobierano na płuczki wypełnione roztworem hydroksyloaminy i oznaczano polarograficznie (Birch 1994). Zakres stosowania tej metody wynosi 2,9 ÷ 29 mg/m³ dla próbki powietrza 12 l. Metody nie można stosować w obecności innych aldehydów (np.: akrylaldehydu, formaldehydu, benzaldehydu) w badanym powietrzu.

W metodzie HSE, podobnie jak w metodzie OSHA, próbki powietrza zawierającego aldehydy (w tym but-2-enal) pobierano na filtry z włókna szklanego (o średnicy 25 mm), pokryte 2,4-DNFH (HSE 2010). Do odzysku 2,4-dinitrofenylohydrazyny but-2-enalu stosowano acetonitryl (2 ml) i tak uzyskany roztwór oznaczano chromatograficznie z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekłowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD).

Metoda ma charakter ogólny, nie podano dokładnych informacji na temat oznaczania but-2-enalu, ani zakresu krzywej wzorcowej czy granicy oznaczalności dla tej substancji.

W Polsce but-2-enal oznaczano z zastosowaniem chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID). Metoda polega na: adsorpcji par but-2-enalu na węglu aktywnym, desorpcji chlorobenzenem i analizie chromatograficznej tak uzyskanego roztworu (PN-Z-04045-05:1982).

Norma ta nie spełnia wymagań normy PN-EN 482 i została wycofana ze zbioru Polskich Norm. Sześciokrotne obniżenie wartości NDS i NDSCh spowodowało konieczność opracowania nowej metody oznaczania but-2-enalu w powietrzu na stanowiskach pracy.

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

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Początkowo but-2-enal pobierano na rurki szklane wypełnione żelazem krzemionkowym (200/100 mg) i desorbowano metanolem, podobnie jak przy oznaczaniu innego aldehydu nienasyconego – 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu), (Jeżewska 2013). Wstępne badania desorpcji były obiecujące. Średni współczynnik desorpcji wyniósł 0,99, jednak podczas 6-godzinnego pobierania próbek powietrza zauważono znaczne straty analitu. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że but-2-enal nie jest trwały podczas przechowywania w temperaturze otoczenia (Hendricks 1990). Z tego powodu podjęto decyzję o oznaczaniu but-2-enalu jako 2,4-DNFH but-2-enalu powstałego w wyniku reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (2,4-DNFH).

Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem diodowym (DAD) sprzężonym on-line oraz automatycznym dozownikiem próbek. Do sterowania procesem oznaczania i zbierania danych zastosowano oprogramowanie ChemStation. W badaniu stosowano kolumnę Ultra C18 o wymiarach 250 · 4,6 mm, o uziarnieniu 5 µm, z przedkolumną o wymiarach: 10 x 4,0 mm (Restek, USA).

Do pobierania próbek powietrza wykorzystano aspiratory Gilian LFS-113 (Sensidyne, USA).

Do przeprowadzenia ekstrakcji analitów z rurek pochłaniających korzystano z wytrząsarki mechanicznej WL-2000 (JWElectronic, Polska). Wzorce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA). Próbki przechowywano w ekzykatorze szafkowym serii EKS (WSL, Polska) oraz w chłodziarce ARDO CO23B-2H (Merloni, Polska).

Odczynniki i materiały

W badaniach korzystano z następujących odczynników: but-2-enal, kwas 2,4-heksadienowy (sorbowy), kwas krotonowy, 3-metoksybutan-1-ol (Acros Organics, USA), (*E*)-but-2-enal (Aldrich, Niemcy), 2,4-DNFH but-2-enal, wzorzec mieszaniny aldehydów i ketonów po derywatywacji z 2,4-DNFH (Supelco, USA), metanol, acetonitryl (Merck, Niemcy), kwas fosforowy(V) (POCh, Polska), 2,4-dinitrofenylohydrazyna (PanReac AppliChem, Niemcy). Do badań używano odczynników o czystości co najmniej cz.d.a. Ponadto stosowano: rurki pochłaniające wypełnione dwiema warstwami (200/100 mg) żelu krzemionkowego (ZUP Analityk, Polska), rurki pochłaniające Orbo-555 wypełnione dwiema warstwami (300/150 mg) żelu krzemionkowego z nanesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną (Supelco, USA), szkło laboratoryjne oraz strzykawki do cieczy.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

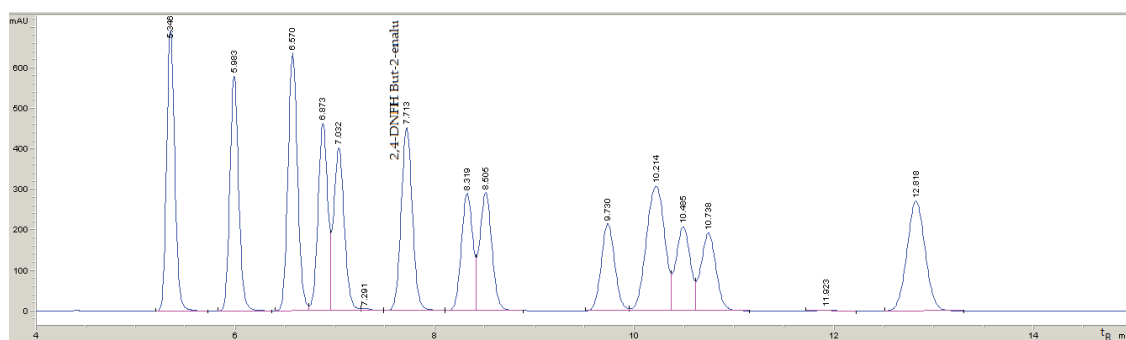
Ustalenie warunków oznaczania

Parametry oznaczania chromatograficznego 2,4-dinitrofenylohydrazyny (2,4-DNFH) but-2-enalu były następujące: kolumna Ultra C18 – temperatura ko-

lunna 20 °C, faza ruchoma – acetonitryl: woda (85:15, v/v), natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min, długość fali analitycznej detektora DAD, $\lambda = 380$ nm, dozowanie próbek 10 µl.

W opisanych warunkach sprawdzono możliwość oznaczania but-2-enalu w obecności: kwasu 2,4-heksadienowego, kwasu krotonowego, 3-metoksybutan-

-1-olu oraz 2,4-dinitrofenylohydrazyny (2,4-DNFH) innych aldehydów i ketonów (rys. 1.).



Rys. 1. Chromatogram roztworu wzorcowego 2,4-DNFH but-2-enalu w obecności mieszaniny wzorcowej 2,4-dinitrohydrazonów aldehydów i ketonów (formaldehydu, acetaldehydu, akrylaldehydu, acetonu, propanalu, butanal, benzaldehydu, 3-metylobutanalu, pentanal, 2-, 3-, i 4-metylobenzaldehydu, heksanal, 2,5-dimetylobenzaldehydu) firmy Supelco. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 380$ nm)

Ustalenie warunków pobierania próbek powietrza

Przez układ składający się z: pipety szklanej o pojemności 1 l (do której wprowadzano po 10 μ l roztworu but-2-enalu w metanolu o stężeniu odpowiadającym

w powietrzu: 1; 2 i 4 mg/m^3), rurki pochłaniającej (zawierającej dwie warstwy żelu krzemionkowego z naniesioną 2,4-DNFH (300/150 mg)), aspiratora i rotametu, przepuszczano 12 l powietrza ze strumieniem objętości: 2; 4 i 6 l/h. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Przykładowe wyniki adsorpcji but-2-enalu na żelu krzemionkowym z naniesioną 2,4-DNFH, desorpcja acetonitrylem (2 ml). Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 380$ nm)

Przybliżone stężenie substancji w powietrzu, mg/m^3	Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h	Czas pochłaniania, h	Powierzchnia pików pochodnej but-2-enalu w roztworach po desorpcji	
			I warstwa	II warstwa
1	6	2	1490,8	brak pików
2	6	2	2787,6	brak pików
2	4	3	2102,0	brak pików
2	2	6	2496,6	brak pików
4	4	3	6323,1	brak pików

Uzyskane wyniki badań wskazują na całkowite zatrzymywanie się but-2-enalu w pierwszej warstwie żelu. Druga warstwa żelu nie zawierała badanej substancji.

Badanie stopnia desorpcji

Badanie stopnia desorpcji 2,4-dinitrofenylohydrazyny (2,4-DNFH) but-2-enalu z żelu krzemionkowego przeprowadzono w następujący sposób: do sześciu rurek, wypełnionych żelem krzemionkowym z naniesioną 2,4-DNFH na włókno szklane znajdujące się przed 300 mg warstwą żelu, nanoszono

w trakcie pobierania próbek powietrza po 1 μ l roztworu but-2-enalu w metanolu o stężeniu 1,45 mg/ml oraz po: 5 i 10 μ l roztworu but-2-enalu w metanolu o stężeniu 2,9 mg/ml . Przez rurki przepuszczano 12 l czystego powietrza ze strumieniem objętości 2 l/h. Następnie przeprowadzono desorpcję 2,4-DNFH but-2-enalu (acetonitrylem – 2 ml) z pierwszej (300 mg) warstwy żelu i oddzielnie z drugiej (150 mg) warstwy kontrolnej. Po 30-minutowym wytrząsaniu uzyskane roztwory oznaczano chromatograficznie. W drugiej zabezpieczającej warstwie żelu nie stwierdzono obecności badanej substancji. Wykonano także oznaczanie but-2-enalu

w roztworach porównawczych wykonanych w identyczny sposób, ale zamiast żelu z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną dodano 2,4-dinitrofenylohy-

drazynę (roztwór do derywatywacji, patrz: załącznik, punkt 5.10.). Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Badania stopnia desorpcji but-2-enalu z żelu krzemionkowego z naniesioną 2,4-DNFH. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 380$ nm)

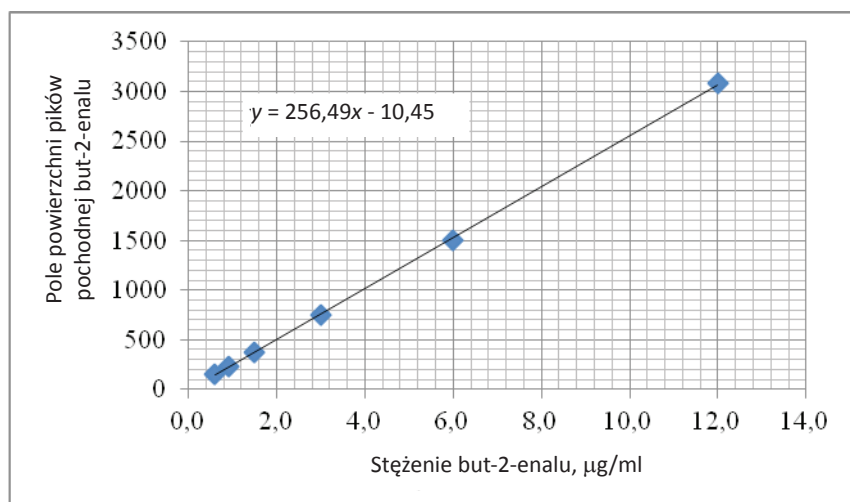
Masa but-2-enalu naniesiona na żel, μg	Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych	Średni współczynnik desorpcji
1,45	176,7	175,9	1,00
14,5	1922,0	1843,0	1,04
29	4089,1	3890,0	1,05

Średni współczynnik desorpcji dla trzech poziomów stężeń wynosi 1,03.

Kalibracja i precyzja

Oznaczanie kalibracyjne wykonano dla sześciu roztworów wzorcowych 2,4-dinitrofenylohydrazyny (2,4-DNFH) but-2-enalu w acetonitrylu. Zakres roztworów wzorcowych wynosi $0,6 \div 12 \mu\text{g/ml}$. Sporządzono trzy serie roztworów kalibracyjnych, które

poddano analizie chromatograficznej. Do chromatografu wprowadzono po $10 \mu\text{l}$ roztworów wzorcowych o wzrastających stężeniach. Następnie sporządzono wykres zależności średniej powierzchni pików 2,4-DNFH but-2-enalu z roztworów wzorcowych od stężeń but-2-enalu (rys. 2., tab. 3.). Współczynnik nachylenia „ b ” krzywej kalibracji o równaniu $y = bx + a$, charakteryzujący czułość metody, wynosi 256,5. Współczynnik korelacji „ r ” charakteryzujący liniowość krzywej kalibracyjnej wynosi 0,9999.



Rys. 2. Wykres zależności powierzchni pików pochodnej but-2-enalu od stężenia but-2-enalu w roztworach wzorcowych. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 380$ nm)

Tabela 3.

Parametry kalibracji dla trzech serii pomiarowych

Seria pomiarowa	Krzywa kalibracji ($y = bx + a$)	Współczynnik korelacji, r	Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji	Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, %
I	$y = 256,36 x - 10,05$	0,9999	3,62	1,43
II	$y = 256,44 x - 10,29$	0,9999		
III	$y = 256,68 x - 11,01$	0,9999		
Średnia z I-III	$y = 256,49 x - 10,45$	0,9999		

Precyzję oznaczeń kalibracyjnych oceniono na podstawie analizy trzech serii po osiem roztworów roboczych o stężeniach but-2-enalu kolejno: 0,6 (I seria); 6 (II seria) i 12 $\mu\text{g/ml}$ (III seria). Po wykonaniu analizy chromatograficznej dla każdej serii obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężenia wyniosły odpowiednio: 1,32; 0,49 i 0,76%.

Badanie trwałości próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza badano po jednym dniu oraz po: dwóch i dziewięciu dniach przechowywania w eksykatorze i w zamrażalniku chłodziarki. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4.

Wyniki badania trwałości próbek powietrza, przechowywanych w temperaturze pokojowej i w zamrażalniku chłodziarki. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 380 \text{ nm}$)

Numer rurki	Miejsce przechowywania	Czas przechowywania, liczba dni	Średnie pola powierzchni pików	Średnie pole powierzchni pików z dwóch filtrów
1 2	eksykator	1	1817,7 1849,6	1833,7
1 2		2	1617,25 1611,6	1614,4
1 2		9	281,6 492,05	386,8
1 2	zamrażalnik chłodziarki	1	2099,6 2121,95	2110,8
1 2		2	2180,1 2169,7	2174,9
1 2		9	2006,35 1991,35	1998,85

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że próbki nie mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej. Próbki przechowywane w zamrażalniku chłodziarki zachowują trwałość do dziewięciu dni.

Walidacja metody

Parametry walidacyjne wyznaczano zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną i wymaganiami zawar-

tymi w normie europejskiej PN-EN 482. W celu wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności przygotowano trzy ślepe próby. Roztwory żelaz krzemionkowego z naniesioną 2,4-DNFH analizowano chromatograficznie (po 10 pomiarów dla każdej ślepej próby). Na podstawie wyników analizy powierzchni pików o czasie retencji pochodnej but-2-enalu wyznaczono granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności. Uzyskane dane walidacyjne przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5.

Dane walidacyjne metody oznaczania but-2-enalu

Walidowane parametry	Wartość
Zakres pomiarowy	0,1 ÷ 2 mg/m^3
Ilość pobranego powietrza	12 l
Zakres krzywej wzorcowej	0,6 ÷ 12 $\mu\text{g/ml}$
Granica wykrywalności	1,26 ng/ml (0,21 $\mu\text{g/m}^3$)
Granica oznaczalności	3,77 ng/ml (0,63 $\mu\text{g/m}^3$)
Całkowita precyzja badania	5,08%
Względna niepewność całkowita	11%
Niepewność rozszerzona	22%

PODSUMOWANIE

W artykule przedstawiono metodę oznaczania but-2-enalu w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metoda polega na przepuszczeniu badanego powietrza, zawierającego but-2-enal, przez rurkę szklaną wypełnioną żelalem krzemionkowym z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną. Po desorpcji acetonitrylem, 2,4-dinitrofenylohydrazon but-2-enalu analizowano chromatograficznie z zastosowaniem kolumny Ultra C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm).

Opracowana metoda umożliwiła oznaczanie but-2-enalu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie stężeń 0,1 ÷ 2 mg/m³, tj. od 1/10 do 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN 482. Metoda może być wykorzystana przez laboratoria higieny pracy do wykonywania pomiarów zawartości par but-2-enalu w powietrzu na stanowiskach pracy, a także oceny narażenia pracowników na tę substancję.

PIŚMIENNICTWO

Birch M.E. (1994). Crotonaldehyde. Method 3516. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Fourth Edition, Cincinnati, OH. National Institute for Occupational Safety and Health.

CHEMPYŁ (2018). Baza wiedzy o zagrożeniach chemicznych i pyłowych [Knowledge database on chemical and aerosol hazards]. Warszawa, CIOP-PIB.

ECHA (2018). European Chemicals Agency. Helsinki, Finland.

GESTIS (2018). Substance database. BG Institute for Occupational Safety and Health, Sankt Augustin, Germany.

Grote A.A., Kennedy E.R. (1994). Aldehydes, screening. Method No 2539. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Fourth Edition, Cincinnati, OH. National Institute for Occupational Safety and Health.

Harbison R.D., Bourgeois M.M., G.T. Johnson (2015). Crotonaldehyde. [W:] Hamilton and Hardy's Industrial Toxicology. John Wiley & Sons. Wyd. 6, 464–466.

Hendricks W. (1990). Crotonaldehyde. Method No 81. Occupational Safety & Health Administration U.S. Department of Labor (OSHA), Organic Methods Evaluation Branch, OSHA Salt Lake City, Utah.

HSE (2010). Aldehydes in air. Laboratory method using high performance liquid chromatography. Methods for the Determination of Hazardous Substances. MDHS method 102. Health and Safety Executive, Occupational Medicine and Hygiene Laboratory. UK.

IARC (1995). Crotonaldehyde. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries & Evaluations 63, 373–391.

IPCS (2017). International Chemical Safety Cards. ICSC: 0241 Crotonaldehyde. International Programme

on Chemical Safety prepared by an international group of experts on behalf of ILO and WHO, with the financial assistance of the European Commission. IPCS INCHEM.

Jeżewska A. (2013). Oznaczanie 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu w powietrzu na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [3,7-Dimetylookta-2,6-dienal. Determination in workplace air with high performance liquid chromatography]. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment] 1(75), 127–138.

Kilanowicz A., Sapota A., Darago A. (2017). But-2-enal – mieszanina izomerów - E-but-2-enal i Z-but-2-enal. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [But-2-enal –mixture of Z(cis) and E(trans) isomers. Documentation of proposed values of occupational exposure limits]. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment] 4(94), 5–33.

Obwieszczenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 7.06.2017 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Pracy i Polityki Społecznej w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 2017, poz. 1348 [Polish legal act].

PN-EN 482+A1:2016 Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Workplace exposure – General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents].

PN-Z-04045-05:1982 Ochrona czystości powietrza – Badań zawartości aldehydów – Oznaczanie aldehydu krotonowego na stanowiskach pracy metodą chromatografii gazowej z wzbogacaniem próbki [Polish standard].

Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12.06 2018 r. w sprawie najwyższych

dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 2018, poz. 1286 [Polish legal act].

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (zwane rozporządzeniem GHS). Dz. Urz.

UE z dnia 31.12.2008 r. (L 353) [Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Text with EEA relevance)].

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA BUT-2-ENALU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości but-2-enalu (nr CAS: 4170-30-3) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografu cieczowego z detektorem spektrofotometrycznym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie but-2-enalu, jakie można oznaczyć w warunkach: pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania, opisanych w procedurze, wynosi 0,1 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 12 l).

2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Metoda polega na: adsorpcji but-2-enalu na żelu krzemionkowym z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną, ekstrakcji acetonitrylem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Postanowienia ogólne

4.1. Dokładność ważenia

O ile nie zaznaczono inaczej, substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,0002 g.

4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

Czynności, podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać z użyciem środków ochrony indywidualnej, pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Pozostałe po analizie roztwory odczynników i wzorców należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji w uprawnionych instytucjach.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

Do analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować substancje o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.:

- 5.1. But-2-enal
- 5.2. Acetonitryl, o czystości do HPLC
- 5.3. 2,4-Dinitrofenylohydrazyna
- 5.4. 2,4-Dinitrofenylohydrazon but-2-enalu
- 5.5. Kwas fosforowy(V), roztwór 85-procentowy
- 5.6. Metanol, o czystości do HPLC
- 5.7. Roztwór wzorcowy podstawowy 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć 21,4 mg 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu wg punktu 5.4., uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.2. i dokładnie wymieszać. Stężenie but-2-enalu w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,6 mg/ml.

- 5.8. Roztwory wzorcowe robocze 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 10; 15; 25; 50; 100 i 200 µl roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 5.7., uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.2. i wymieszać. Stężenie but-2-enalu w tak przygotowanych roztworach wynosi odpowiednio: 0,6; 0,9; 1,5; 3; 6 i 12 µg/ml.

- 5.9. Roztwór do wyznaczenia współczynnika desorpcji

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć około 24 mg but-2-enalu wg punktu 5.1., uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.6. i dokładnie wymieszać. Stężenie but-2-enalu w tak przygotowanym roztworze wynosi około 2,4 mg/ml.

Roztwory wg punktów: 5.7., 5.8. i 5.9. należy przygotowywać bezpośrednio przed analizą.

- 5.10. Roztwór do derywatywacji

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 5 ml odważyć około 20 mg 2,4-dinitrofenylohydrazyny wg punktu 5.3., dodać 0,1 ml kwasu fosforowego(V) wg punktu 5.5. i uzupełnić do kreski acetonitrylem.

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość przez co najmniej 12 miesięcy.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować przyrządy pomiarowe i wymieniony sprzęt pomocniczy:

6.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie analizy przy długości fali analitycznej $\lambda = 380$ nm.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca rozdzielanie 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, wypełniona fazą oktadecylową o uziarnieniu 5 μ m.

6.3. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 7.

6.4. Naczynka do desorpcji

Naczynka szklane, o pojemności około 3 ml z nakrętkami i uszczelkami silikonowymi, wyposażone w zawory umożliwiające pobieranie roztworu bez otwierania naczynek.

6.5. Rurki pochłaniające

Dostępne w handlu rurki szklane wypełnione dwiema warstwami żelu krzemionkowego (300 i 150 mg) z naniesioną 2,4-dinitrofenylohydrazyną.

6.6. Strzykawki do cieczy

Strzykawki do cieczy o pojemności 5 μ l ÷ 2,5 ml.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek powietrza, przez rurkę pochłaniającą wg punktu 6.5., przepuścić do 12 l badanego powietrza do oceny zgodności warunków pracy z wartością najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), dwukrotnie po 1,5 l badanego powietrza do oceny zgodności warunków pracy z wartością najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 6 l/h.

Pobrane próbki, przechowywane w zamrażalniku chłodziarki, zachowują trwałość do dziewięciu dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby uzyskać rozdzielanie 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej o parametrach podanych w punkcie 6.2., przykładowe warunki wykonania oznaczania są następujące:

- temperatura kolumny 20 °C

- faza ruchoma: acetonitryl: woda 85: 15
- natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min
- długość fali analitycznej detektora 380 nm
- dozowanie próbki 10 μ l.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 10 μ l roztworów wzorcowych roboczych 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu wg punktu 5.8. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych stężenie but-2-enalu, w mikrogramach na mililitr, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu.

10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza przesypać oddzielnie każdą warstwę żelu krzemionkowego z rurki pochłaniającej wg punktu 6.5. do naczynek do desorpcji wg punktu 6.4. Następnie dodać po 2 ml acetonitrylu wg punktu 5.2., naczynka szczelnie zamknąć i przeprowadzić desorpcję w ciągu 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Następnie pobrać po 10 μ l roztworu znad żelu krzemionkowego i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 8. Z każdego roztworu wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Z krzywych wzorcowych odczytać stężenie but-2-enalu w badanym roztworze.

W taki sam sposób wykonać oznaczanie but-2-enalu w roztworze znad krótszej warstwy żelu krzemionkowego. Stężenie but-2-enalu oznaczone w krótszej warstwie żelu krzemionkowego nie powinno przekraczać 10% stężenia oznaczonego w dłuższej warstwie żelu krzemionkowego. W przeciwnym razie wynik należy traktować jako orientacyjny.

11. Wyznaczanie współczynnika desorpcji

Do pięciu naczynek do desorpcji, wg punktu 6.4., przesypać dłuższą warstwę żelu (300 mg) z rurki pochłaniającej wg punktu 6.5. Następnie dodać po 5 μ l roztworu do wyznaczania współczynnika desorpcji wg punktu 5.9. W szóstym naczynku przygotować roztwór kontrolny zawierający tylko żel. Naczynka szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać po 2 ml acetonitrylu wg punktu 5.2. Naczynka ponownie zamknąć i przeprowadzić desorpcję w ciągu 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Jednocześnie wykonać oznaczenie badanej substancji, co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 5 μ l roztworu do desorpcji wg punktu 5.9., 100 μ l roztworu do derywatywacji wg punktu 5.10. i 1,9 ml acetonitrylu wg punktu 5.2. Tak uzyskane roztwory badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 8.

Współczynnik desorpcji but-2-enalu (d) obliczyć na podstawie wzoru:

$$d = \frac{P_d - P_o}{P_p},$$

w którym:

- P_d – średnia powierzchnia pików 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu na chromatogramach roztworów po desorpcji,
- P_o – średnia powierzchnia pików 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu na chromatogramach roztworu kontrolnego,

P_p – średnia powierzchnia pików 2,4-dinitrofenylohydrazonu but-2-enalu na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynnika desorpcji but-2-enalu (\bar{d}) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Współczynnik desorpcji należy wyznaczać dla każdej nowej partii rurek pochłaniających wg punktu 6.5.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie but-2-enalu (X) w badanym powietrzu obliczyć na podstawie wzoru, w miligramach na metr sześcienny:

$$X = \frac{2 \cdot (c_1 + c_2)}{V \cdot \bar{d}},$$

w którym:

- c_1 – stężenie but-2-enalu w roztworze znad pierwszej warstwy żelu, odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- c_2 – stężenie but-2-enalu w roztworze znad drugiej warstwy żelu, odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- V – objętość powietrza przepuszczonego przez rurkę pochłaniającą, w litrach,
- \bar{d} – średnia wartość współczynnika desorpcji wyznaczona zgodnie z punktem 11.,
- 2 – objętość acetonitrylu stosowana do desorpcji, w mililitrach.

