

Metoksyanilina

Oznaczanie w powietrzu środowiska pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej¹

Methoxyaniline

Determining in workplace air with HPLC

mgr MARZENA BONCZAROWSKA
e-mail: marzena@imp.lodz.pl
dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI
e-mail: slawek@imp.lodz.pl
dr JAN GROMIEC
e-mail: jpgrom@imp.lodz.pl
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

2-Metoksyanilina nr CAS: 90-04-0
4-Metoksyanilina nr CAS: 104-94-9

Słowa kluczowe: 2-metoksyanilina, 4-metoksyanilina, metoda oznaczania, metoda chromatografii cieczowej, powietrze na stanowiskach pracy.

Keywords: 2-methoxyaniline, 4-methoxyaniline, determination method, workplace air, HPL.

Streszczenie

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania 2-metoksyaniliny (2-MA) i 4-metoksyaniliny (4-MA) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym lub spektrofluorymetrycznym.

Metoda polega na: adsorpcji izomerów metoksyaniliny na żywicy Amberlite XAD-2, ekstrakcji acetonitrylem zatrzymanych związków, reakcji 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny z chloromrówczanem 9-fluorenylometylu oraz oznaczeniu, powstałych w wyniku reakcji pochodnych,

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2011-2013 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

wysokosprawną chromatografią cieczową. Metoda umożliwia oznaczanie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny w zakresie stężeń od 0,025 ÷

1 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 200 l). Granica oznaczalności (LOQ) tej metody wynosi 0,01 µg/ml (FLD).

Summary

A new procedure has been developed for the assay of methoxyaniline (anisidine) isomers with high-performance liquid chromatography with a FLD or UV-VIS detector. The method is based on the adsorption of 2-methoxyaniline (2-MA) and 4-methoxyaniline (4-MA) on Amberlite XAD-2. Adsorbed compounds are eluted with aceto-nitrile and derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc Cl). The re-

sulted solutions are analysed with high performance chromatography with ultraviolet or spectro-fluorimetric detection. The working range of the analytical method is 0.025 ÷ 1 mg/m³ for a 200-L air sample. Limit of quantification: 0.01 µg/ml (FLD). The developed method of determining methoxy-aniline (anisidine) isomers has been recorded as an analytical procedure (see Appendix).

WPROWADZENIE

2-Metoksyanilina (*o*-anizydyna, 2-aminoanizol) jest w temperaturze pokojowej bezbarwną lub żółtawą oleistą cieczą o charakterystycznym aminowym zapachu. Związek ten miesza się w każdym stosunku z: alkoholem etylowym, eterem dietylowym, acetonem i benzenem. 2-Metoksyanilina jest rozpuszczalna w rozcieńczonych kwasach mineralnych i eterze, natomiast jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie.

2-Metoksyanilina jest produkowana na drodze redukcji 2-metoksynitrobenzenu żelazem lub przez uwodornienie tego związku w obecności katalizatorów (platyny lub palladu na węglu aktywowanym). Związek ten może być otrzymywany także przez ogrzewanie *o*-aminofenolu z metylosiarczanem potasu. 2-Metoksyanilina jest stosowana do produkcji: barwników, leków lub substancji zapachowych.

W warunkach narażenia zawodowego do organizmu człowieka może dostawać się przez bezpośredni kontakt ze skórą lub drogą inhalacyjną. 2-Metoksyanilina działa drażniąco na: skórę, błony śluzowe oczu i układu oddechowego. Narażenie na ten związek może wywołać methemoglobinemię. Narażenie na 2-metoksyanilinę o dużym stężeniu może powodować trudności w oddychaniu, zapaść, a nawet śmierć. Powtarzane narażenie na ten związek może

wywołać: anemię, kontaktową alergię skóry, zapalenie oskrzeli oraz uszkodzenie nerek i układu nerwowego (HSDB 2013a). Grupa Ekspertów Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła 2-metoksyanilinę do grupy 2.B, tj. do grupy związków uznawanych za przypuszczalnie rakotwórcze dla ludzi (IARC 1999).

4-Metoksyanilina (*p*-anizydyna, 4-aminoanizol) jest w temperaturze pokojowej ciałem stałym, występującym w postaci białych kryształków lub płytek o charakterystycznym aminowym zapachu. Związek ten jest dobrze rozpuszczalny w: eterze, etanolu, acetonie i benzenie, natomiast słabo rozpuszcza się w wodzie. Na skalę przemysłową 4-metoksyanilina jest produkowana przez etylowanie *p*-aminofenolu lub na drodze redukcji 1-metoksy-4-nitrobenzenu siarczanem sodu albo przez uwodornienie w obecności katalizatora niklowego. 4-Metoksyanilina jest stosowana do produkcji barwników oraz jako półprodukt w syntezie chemicznej. Związek ten działa drażniąco na błony śluzowe oczu i układu oddechowego. Wdychana 4-metoksyanilina może powodować kaszel oraz utrudniony oddech. Podobnie jak 2-metoksyanilina może wywołać methemoglobinemię. Narażenie na 4-metoksyanilinę o dużym stężeniu może powodować: trudności w oddychaniu, zapaść, a nawet śmierć. Powtarzane naraże-

nie na ten związek może wywołać: anemię, kontaktową alergię skóry, zapalenie oskrzeli oraz uszkodzenie nerek i układu nerwowego (HSDB 2013b). Grupa Ekspertów Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła 4-metoksyanilinę do grupy 3., tj. do grupy związków nieklasyfikowanych jako rakotwórcze dla ludzi (IARC 1999).

Klasyfikację oraz oznakowanie obu izomerów

metoksyaniliny, zgodnie z tabelą 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwanego rozporządzeniem CLP (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r.) przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Klasyfikacja i oznakowanie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny zgodnie z obowiązującymi aktami prawnymi

Klasyfikacja/oznakowanie	2- Metoksyanilina	4-Metoksyanilina
Rakotwórczość	kategoria 1.B	kategoria 1.B
Działanie mutagenne na komórki rozrodcze	kategoria 2.	
Toksyczność ostra, wdychanie	kategoria 3.	kategoria 2.
Toksyczność ostra, skórnie	kategoria 3.	kategoria 1.
Toksyczność ostra, doustnie	kategoria 3.	kategoria 3.
Działanie toksyczne na narządy docelowe – powtarzane narażenie	–	kategoria 2.
Toksyczność ostra dla środowiska wodnego	–	kategoria 1.
H301	działa toksycznie po połknięciu	działa toksycznie po połknięciu.
H310	–	grozi śmiercią w kontakcie ze skórą
H311	działa toksycznie w kontakcie ze skórą	–
H330	–	wdychanie grozi śmiercią
H331	działa toksycznie w następstwie wdychania	–
H341	podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne	–
H350	może powodować raka	–
H373	–	może powodować uszkodzenie narządów przez długotrwałe lub wielokrotne narażenie
H400	–	działa bardzo toksycznie na organizmy wodne
T	produkt toksyczny	
T+	–	produkt bardzo toksyczny
N	–	produkt niebezpieczny dla środowiska
R 23/24/25	działa toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu	–
R26/27/28	–	działa bardzo toksycznie, również przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R33	–	niebezpieczeństwo kumulacji w organizmie
R45	może powodować raka	
R50		działa bardzo toksycznie na organizmy wodne

cd. tab. 1.

Klasyfikacja/oznakowanie	2- Metoksyanilina	4-Metoksyanilina
R68	możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia	–

Wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny w powietrzu na stanowiskach pracy wynosi $0,5 \text{ mg/m}^3$, a najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe (NDSCh) 1 mg/m^3 (DzU 2002, nr 217, poz. 1833).

2-Metoksyanilina i 4-metoksyanilina są zwykle oznaczane przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), (NIOSH 2003; Lizier, Zanozi 2012) lub kapilarnej chromatografii gazowej (GC), (EPA 1989; 2007; Wood, Anderson 1975), a do pobierania próbek powietrza wykorzystuje się najczęściej rurki sorbcyjne wypeł-

nione żywicą Amberlite XAD-2 (NIOSH 2003) lub żelem krzemionkowym (Wood, Anderson 1975). Opisany w NIOSH (2003) sposób postępowania zakłada bezpośrednią analizę chromatograficzną (detektor UV-VIS) związku wyekstrahowanego z żywicy XAD-2.

Celem pracy było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny w powietrzu środowiska pracy w zakresie stężeń od $0,025 \div 1 \text{ mg/m}^3$, czyli od 1/10 do 2 wartości NDS, zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482.

CZĘŚĆ BADAWCZA

Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Waters model Breeze wyposażony w: pompę binarną, termostat, detektor spektrofotometryczny (Waters 2487), detektor spektrofluorymetryczny HP 1046A, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i zbierania danych oraz chromatograf cieczowy firmy Waters model Alliance wyposażony w pompę poczwórną, detektor spektrofotometryczny (Waters PAD 2996), detektor spektrofluorymetryczny (Waters 2475), automatyczny dozownik próbek, termostat i komputer z programem sterowania i zbierania danych.

Analizy chromatograficzne wykonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm o uziarnieniu $4 \mu\text{m}$. Próbki powietrza pobierano aspiratorami średnioprzepływowymi firmy Gilian model GilAir 3.

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: 2-metoksyanilinę (Aldrich), 3-metoksyanilinę (Aldrich), 4-metoksyanilinę (Aldrich), acetonitryl (JT Baker), chloromrówczan 9-fluorenylometylu, (FMOC Cl)

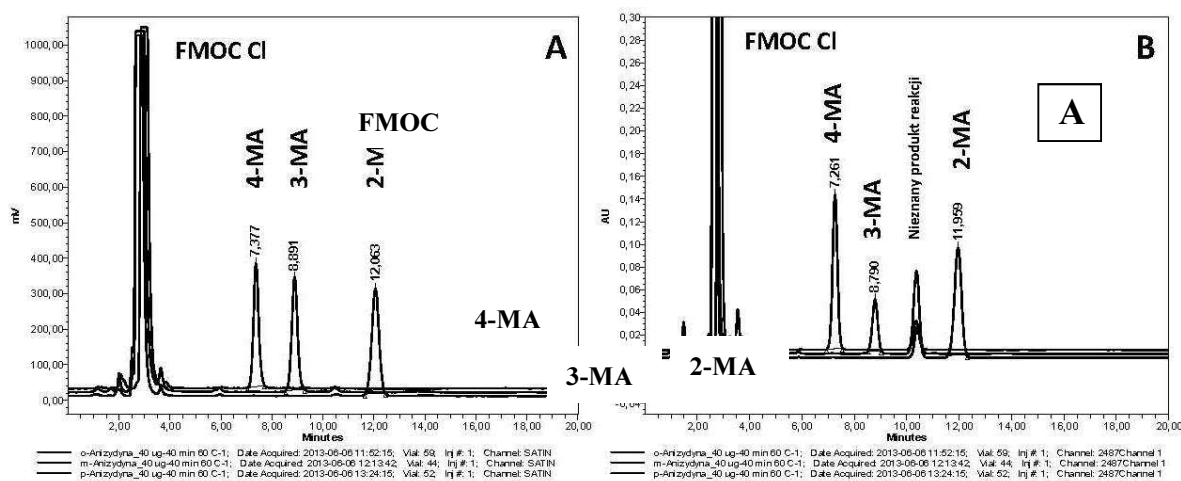
(Fluka), kwas borowy (POCh), disodu tetraboran $\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (POCh), wodę do HPLC oraz żywicę Amberlite XAD-2 (Supelco), rurki szklane do pobierania próbek powietrza, a także pipety automatyczne nastawne o pojemności $0,01 \div 0,1 \text{ ml}$ i $0,1 \div 1 \text{ ml}$, szkło laboratoryjne, strzykawki do cieczy itp.

Ustalenie warunków oznaczania

W opisanych w piśmiennictwie metodach oznaczania metoksyaniliny w powietrzu z zastosowaniem techniki HPLC (NIOSH 2003; Lizier, Zanozi 2012) wykorzystuje się kolumny analityczne wypełnione złożem oktadecylowym (C-18). Celem określenia optymalnych warunków oznaczania metoksyaniliny przygotowano roztwory pochodnych izomerów 2-, 3- i 4-metoksyaniliny i poddano je analizie chromatograficznej z wykorzystaniem warunków podanych w tabeli 2. Rozdziałów chromatograficznych dokonywano, stosując kolumnę analityczną Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm, o uziarnieniu $4 \mu\text{m}$, którą eluowano mieszaniną acetonitrylu i wody (elucja izokratyczna) zmieszanyymi w stosunku 62: 38 (v: v). Wyniki badania (chromatogram) przedstawiono na rysunku 1.

Tabela 2.
Warunki pracy chromatografu cieczonego

Kolumna analityczna	Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm; o uziarnieniu 4 μ m	
Faza ruchoma	acetonitryl	woda
Program – izokratycznie (v: v)	62	38
Strumień objętości	0,3 ml/min	
Temperatura kolumny	35 °C	
Długość fali analitycznej	265 nm (UV-VIS)	Ex/Em 265/360 nm (FLD)
Objętość próbki	10 μ l	



Rys. 1. Analiza roztworów pochodnych izomerów metoksyaniliny po zastosowaniu kolumny Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm oraz detektorów FLD (A) i UV-VIS (B)

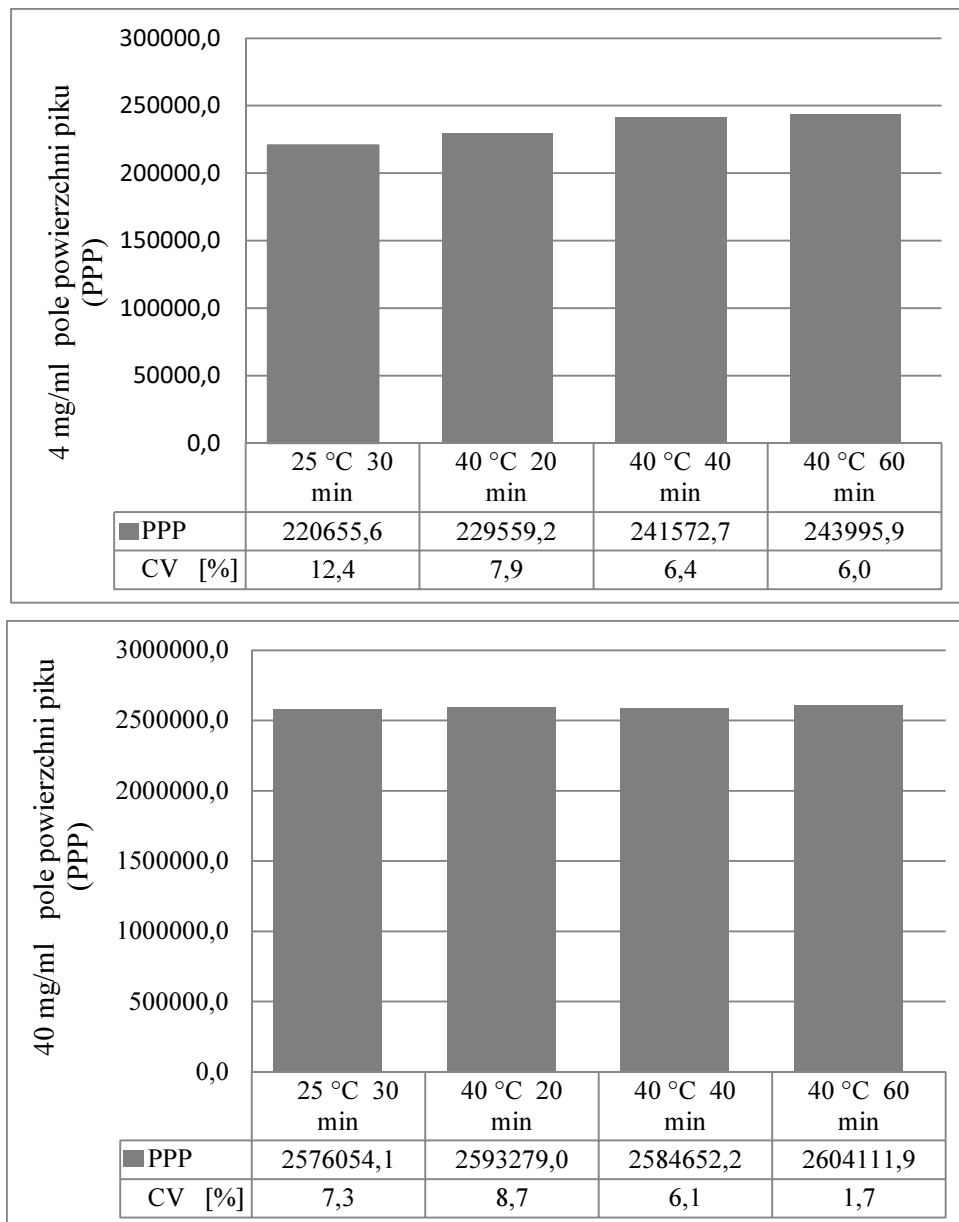
Do oznaczania związków aminowych często się wykorzystuje zdolność tych substancji do tworzenia pochodnych z takimi czynnikami derywatyzującymi, jak: chlorek dansylu (Coppex 2000; *Paseiro-Cerrato* i in. 2011), fluoresceina (Coppex 2000; *Asthana* i in. 2000) bądź chloromróweczan 9-fluorenylometylu, (FMOC Cl), (*Coppex 2000; Lozanov* i in. 2007; *Zhao, Suo* 2008; *Jambor, Molnar-Perl* 2009; *Molnar-Perl* 2011). Ostatni z wymienionych związków był już wcześniej stosowany z powodzeniem do oznaczania glifosatu w powietrzu i z tego względu postanowiono sprawdzić możliwości zastosowania FMOC Cl do ilościowych oznaczeń izomerów metoksyaniliny w powietrzu. Celem otrzymania pochodnych izomerów me-

toksyaniliny przygotowano acetonitrylowe roztwory tych związków o stężeniach 4 i 40 μ g/ml. Dla izomerów o każdym stężeniu przygotowano po 24 wiale o pojemności 2 ml, do których przenoszono po 0,25 ml tak przygotowanych roztworów, a następnie dodawano po 0,25 ml buforu boranowego o stężeniu 0,2 mol/l i pH 8,5 i 0,25 ml acetonitrylowego roztworu FMOC Cl o stężeniu 15 mmol/l oraz 0,25 ml 62-procentowego roztworu acetonitrylu. Całość mieszało i inkubowano w temperaturze 40 °C przez okres 20 ($n = 6$), 40 ($n = 6$) i 60 ($n = 6$) min.

Wykonano dodatkowo badania w temperaturze pokojowej ($n = 6$), prowadząc reakcję przez 30 min. Po zakończeniu inkubacji i doprowadzeniu do temperatury pokojowej roztwo-

ry poddawano analizie chromatograficznej. Na rysunku 2. przedstawiono przykładowo wyniki badań dla 2-metoksyaniliny. Wartości współczynników zmienności (*CV*) wskazują, iż optymalna wydajność reakcji w opisanych warunkach

zostaje osiągnięta po 40 min. Reakcja prowadzona w temperaturze pokojowej powoduje duży rozrzut wyników, zwłaszcza w przypadku mniejszych stężeń 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny.



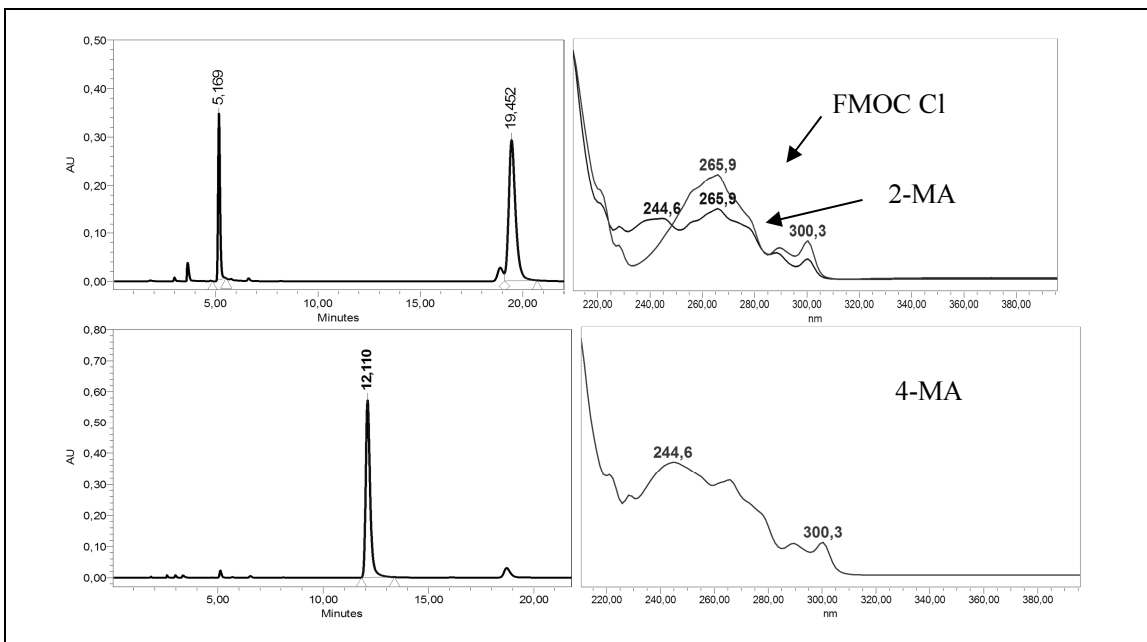
Rys. 2. Wydajność reakcji 2-metoksyaniliny z FMOCl w zależności od czasu i temperatury

Celem określenia optymalnej długości fali analitycznej do oznaczania pochodnych 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny przygotowano acetonirylowe roztwory tych związków o stężeniu 400 $\mu\text{g/ml}$. Przygotowane roztwory poddano reakcji z FMOCl i po ostudzeniu powstałe pochodne poddano analizie chromatograficznej

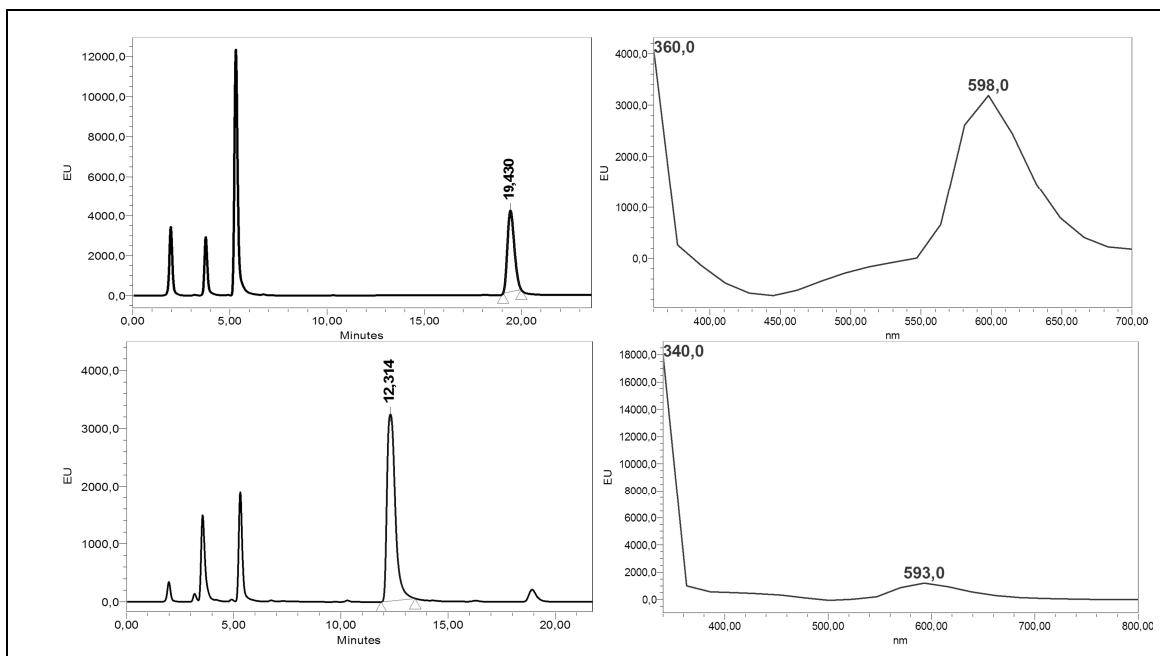
przy zastosowaniu chromatografu ciekowego Waters Alliance wyposażonego w detektor diodowy umożliwiający uzyskanie widma analizowanej substancji w ultrafiolecie (UV) oraz skaningowy detektor spektrofлуorymetryczny pozwalający na rejestrację widma emisji analizowanej substancji przy stałej długości fali wzbudzenia.

denia. Wyniki badań przedstawiono na rysunkach 3. i 4. Z analizy widm badanych pochodnych wynika, że optymalną długością fali analitycznej do oznaczania obu izomerów metoksyaniliny jest $\lambda = 265 \text{ nm}$ (UV-VIS), a w przypadku

analizy spektrofluorymetrycznej (FLD) długościami fal wzbudzenia (λ_{ex}) i emisji (λ_{em}) będą odpowiednio fale o długości 265 i 360 nm i te analityczne długości fali stosowano w dalszych pracach.



Rys. 3. Widmo chloromrówczanu 9-fluorenylometylu (Fmoc Cl) oraz pochodnych 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny w zakresie 200 ÷ 400 nm



Rys. 4. Widmo emisji (λ_{em}) pochodnych 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny z Fmoc Cl w zakresie 340 ÷ 800 nm przy długości fali wzbudzenia (λ_{ex}) 265 nm

Dobór warunków pobierania próbek powietrza

Zgodnie z przyjętymi założeniami obecne w powietrzu związki są zatrzymywane w rurce szklanej wypełnionej żywicą Amberlite XAD-2, wymywane acetonitrylem i po przekształceniu ich w pochodne otrzymane związki – 2-metoksyanilina i 4-metoksyanilina – są ilościowo oznaczane chromatograficznie z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS) i (lub) spektrofluorymetryczną (FLD).

Celem zbadania odzysku 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny z rurek sorpcyjnych przygotowano trzy serie po sześć probówek, do których wsypano po 150 mg Amberlitu XAD-2, na który naniesiono po 0,1 ml acetonitrylowego roztworu mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyanili-

ny o stężeniach: 0,1; 0,5 i 2 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, rurki desorbowano, stosując 5 ml acetonitrylu. Eluaty zbierano do kolb miarowych o pojemności 5 ml i uzupełniano do kreski. Po wymieszaniu objętości otrzymane roztwory poddano reakcji z FMOCl i po ostudzeniu powstałe pochodne poddano analizie chromatograficznej. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabelach 3. i 4. Wyniki badań wskazują, że Amberlite XAD-2 można stosować do pobierania próbek powietrza do oznaczeń izomerów metoksyaniliny. Średnie współczynniki odzysku (dla trzech analizowanych stężeń: 0,01; 0,05 i 0,2 µg/5 ml) 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny wynoszą odpowiednio: 95,5 i 92,0% (detektor UV-VIS) oraz 97,7 i 94,2% (detektor FLD).

Tabela 3.

Wyniki badań odzysku 2-metoksyaniliny (2-MA) z rurek szklanych wypełnionych żywicą Amberlite XAD-2 (UV-VIS)

Ilość 2-MA naniesiona na XAD-2, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, WO, %	Średnia wartość, WO, %
	roztwór kontrolny	ekstrakt		
10	165 518,9 162 983,2 165 437,4	154 458,0	93,8	93,8
		160 630,8	97,6	
		146 890,1	89,2	
		147 003,2	89,3	
		163 653,0	99,4	
		154 413,2	93,8	
		<i>S</i>	4,2	
<i>CV</i>	4,4			
50	800 215,1 808 766,0 726 409,1	771 781,0	99,1	97,9
		772 214,8	99,2	
		773 052,4	99,3	
		773 258,5	99,3	
		703 148,5	90,3	
		780 407,3	100,2	
		<i>S</i>	3,7	
<i>CV</i>	3,8			
200	3279 256,7 3336 481,8 3377 069,0	3 087 208,9	92,7	94,9
		3 156 246,4	94,8	
		3 206 179,8	96,3	
		3 019 793,4	90,7	
		3 247 196,0	97,5	
		3 243 179,7	97,4	
		<i>S</i>	2,7	
<i>CV</i>	2,9			
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %			95,5	
Odchylenie standardowe, <i>S</i>			3,8	
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			4,0	

Tabela 4.

Wyniki badań odzysku 4-metoksyaniliny (4-MA) z rurek szklanych wypełnionych żywicą Amberlite XAD-2 (detektor UV-VIS)

Ilość 4-MA naniesiona na XAD-2, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, WO, %	Średnia wartość, WO, %
	roztwór kontrolny	ekstrakt		
10	158 677,3 160 625,1 159 621,5	140 984,4	88,3	87,1
		139 610,1	87,5	
		134 271,6	84,1	
		135 698,6	85,0	
		141 267,4	88,5	
		141 609,2	88,7	
	<i>S</i>	1,9	<i>CV</i>	2,3
50	774 959,3 782 731,2 676 969,1	705 765,4	94,7	94,2
		702 700,2	94,3	
		701 501,3	94,2	
		706 620,3	94,9	
		687 348,8	92,3	
		704 574,1	94,6	
	<i>S</i>	1,0	<i>CV</i>	1,0
200	3090 620,4 3126 954,9 3095 390,5	2 879 648,6	92,8	94,9
		2 935 503,3	94,6	
		2 963 110,8	95,5	
		2 849 888,9	91,8	
		3 026 098,4	97,5	
		3 018 731,0	97,2	
	<i>S</i>	2,3	<i>CV</i>	2,4
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %			92,0	
Odchylenie standardowe, <i>S</i>			4,0	
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			4,4	

Celem zbadania wpływu przepuszczania powietrza na odzysk izomerów metoksyaniliny z rurek sorpcyjnych (Amberlite XAD-2 150/75 mg) przygotowano trzy serie po sześć rurek, na które naniesiono po 0,1 ml roztworu mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny o stężeniach: 0,1; 0,5 i 2 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, przez rurki przepuszczono 200 l powietrza ze strumieniem objętości 1 l/min. Każdą z sekcji Amberlitu XAD-2 przenoszono do oddzielnych próbek i desorbowano, stosując 5 ml acetonitrylu. Eluaty zbierano do kolb miarowych o pojemności 5 ml i uzupełniano do kreski. Po wymieszaniu, uzyskane roztwory poddano reakcji z FMOCl. Roztwory poreakcyjne przenoszono

do wial o pojemności 1 ml i poddawano analizie chromatograficznej.

Na podstawie wyników badań (tab. 5. i 6.) wykazano, iż badany sorbent może być stosowany do pobierania próbek powietrza do oznaczeń izomerów metoksyaniliny na stanowiskach pracy. Średnie współczynniki odzysku dla trzech analizowanych stężeń (0,01; 0,05 i 0,2 µg/5 ml) 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny wynoszą odpowiednio: 94,0 i 87,2% (detektor UV-VIS) oraz 97,3 i 88,6% (detektor FLD). Zawartości izomerów metoksyaniliny stwierdzone w drugiej warstwie sorbentu w żadnym przypadku nie przekraczały 5% zawartości tych związków stwierdzonej w warstwie pierwszej.

Tabela 5.

Wpływ przepuszczenia 200 l powietrza na odzysk 2-metoksyaniliny (2-MA) z rurek szklanych wypełnionych Amberlitem XAD-2 (detektor UV-VIS)

Ilość 2-MA naniesiona na XAD-2, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, WO, %	Średnia wartość, WO, %
	roztwór kontrolny	ekstrakt		
10	147 962,6 142 190,8 146 212,8	121 348,2	83,4	89,0
		127 977,3	88,0	
		128 347,6	88,2	
		124 956,1	85,9	
		138 490,6	95,2	
		135 783,9	93,4	
		<i>S</i>	4,5	
<i>CV</i>	5,0			
50	727 987,9 724 509,6 722 558,9	711 677,8	98,2	98,4
		776 316,6	107,1	
		697 746,5	96,2	
		692 068,2	95,5	
		720 915,2	99,4	
		684 055,6	94,4	
		<i>S</i>	4,6	
<i>CV</i>	4,7			
200	2940 977,9 2896 642,4 2945 472,7	2 949 410,4	100,7	94,4
		2 890 838,4	98,7	
		2 656 219,0	90,7	
		2 717 033,0	92,8	
		2 716 311,7	92,8	
		2 657 532,8	90,8	
		<i>S</i>	4,3	
<i>CV</i>	4,5			
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %			94,0	
Odchylenie standardowe, <i>S</i>			5,8	
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			6,1	

Tabela 6.

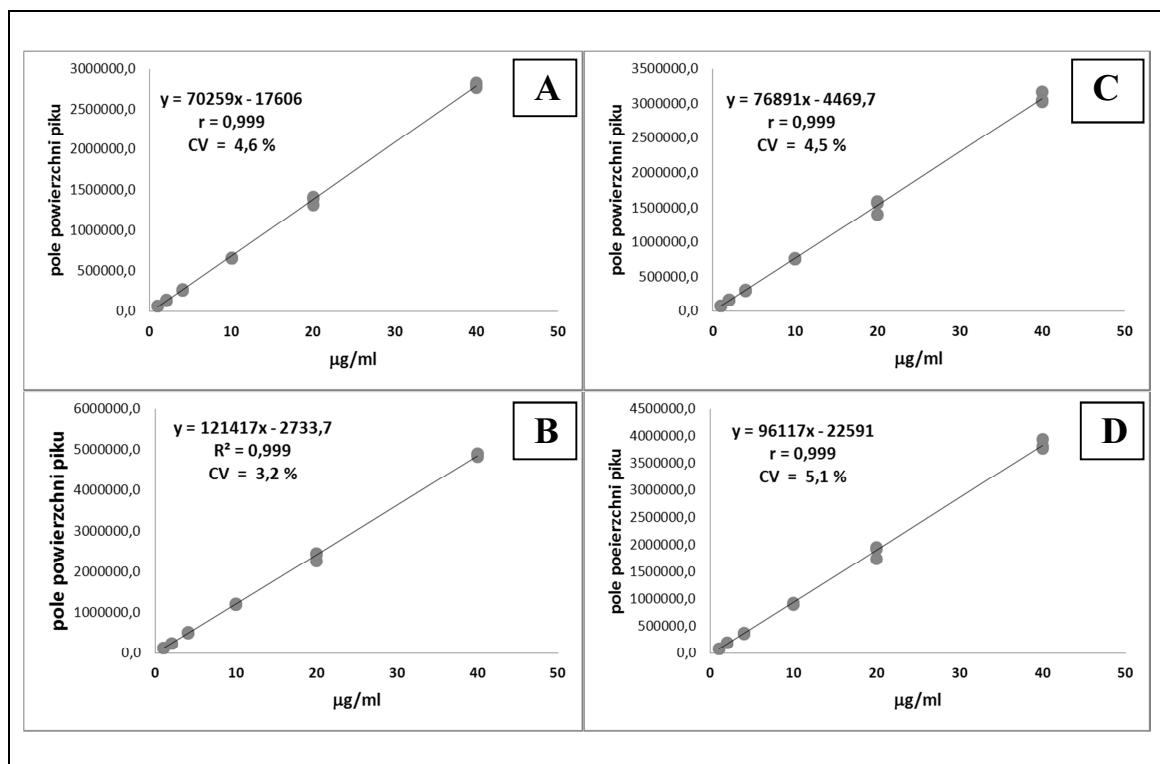
Wpływ przepuszczenia 200 l powietrza na odzysk 4-metoksyaniliny (4-MA) z rurek szklanych wypełnionych Amberlitem XAD-2 (detektor UV-VIS)

Ilość 4-MA naniesiona na XAD-2, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, WO, %	Średnia wartość WO, %
	roztwór kontrolny	ekstrakt		
10	93 803,4 92 712,0 97 993,1	78 254,5	89,5	84,6
		77 838,1	94,0	
		77 914,6	101,5	
		81 098,8	84,5	
		83 998,4	100,2	
		81 991,1	89,2	
		<i>S</i>	2,7	
<i>CV</i>	3,2			
50	590 666,2 568 120,6 571 972,4	493 239,9	85,5	86,2
		539 235,9	93,5	
		493 716,5	85,6	
		461 191,2	79,9	
		508 215,1	88,1	
		488 825,5	84,7	
		<i>S</i>	4,4	
<i>CV</i>	5,1			
200	2584 644,8 2552 406,4 2597 172,6	2 431 470,2	94,3	90,9
		2 362 541,6	91,6	
		2 300 249,6	89,2	
		2 252 588,9	87,4	
		2 390 035,6	92,7	
		2 325 335,1	90,2	
		<i>S</i>	2,5	
<i>CV</i>	2,8			
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %		87,2		
Odchylenie standardowe, <i>S</i>		4,2		
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		4,8		

Kalibracja i precyzja

Celem określenia zakresu roboczego i liniowości metody na trzy serie po siedem rurek wypełnionych żywicą XAD-2 (150 mg) naniesiono pipetą automatyczną po 0,1 ml acetonitrylowych roztworów mieszaniny 2-metoksyaniliny (2-MA) i 4-metoksyaniliny (4-MA) o stężeniach: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 i 2,0 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, pierwszą warstwę XAD-2 przenoszono do probówek i desorbowano, stosując 5 ml acetonitrylu. Eluaty zbierano do kolb miarowych o pojemności 5 ml, uzupełniano do kreski, a następnie poddawano reakcji z FMOC Cl. Po wymieszaniu, ostudzone

roztwory poreakcyjne przenoszono do wial o pojemności 1 ml i poddawano analizie chromatograficznej. Wyniki badania zakresu liniowości metody przedstawiono graficznie na rysunku 5. Z przedstawionych danych wynika, iż zależności odpowiedzi detektora od stężenia 2-metoksyaniliny oraz 4-metoksyaniliny mają charakter liniowy w zakresie 1 ÷ 40 µg/ml. Dla obu analizowanych związków, niezależnie od rodzaju zastosowanego detektora, współczynnik korelacji „r” w analizowanym zakresie stężeń jest równy 0,999, a wyrażony w procentach błąd względny *CV* zawiera się w granicach 3,2 ÷ 5,1%.



Rys. 5. Krzywe wzorcowe 4-metoksyaniliny i 2-metoksyaniliny na żywicy Amberlite XAD-2: A – 4-metoksyanilina, B – 2-metoksyanilina – detektor UV-VIS; C – 4-metoksyanilina, D – 2-metoksyanilina – detektor FLD

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności

Celem określenia granic wykrywalności i oznaczalności metody, mieszaninę pochodnych wzorców 2-metoksyaniliny oraz 4-metoksyaniliny o stężeniu 0,2 µg/ml poddano analizie chromatograficznej ($n = 10$). Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności izomerów metoksyaniliny przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (*Dobecki* 2004), obliczając odchylenie standardowe pól powierzchni pików, a następnie granicę wykrywalności i granicę oznaczenia ilościowego. Wynoszą one dla 2-metoksyaniliny odpowiednio: 0,03 i 0,1 µg/ml (UV-VIS i FLD) oraz dla 4-metoksyaniliny: 0,03 i 0,1 µg/ml (UV-VIS) i 0,02 i 0,07 µg/ml (FLD).

Badanie trwałości pobranych próbek powietrza

Celem zbadania trwałości roztworu mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny przygotowano roztwór tych związków o stężeniu 2 mg/ml. Roztwór przechowywano w szczelnie zamknię-

tym naczyniu przez okres trzydziestu dwóch dni w chłodziarce. Po tym czasie badany roztwór poddano reakcji z FMOC Cl, a po ostudzeniu roztwór poreakcyjny przenoszono do wial o pojemności 1 ml i poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki oznaczeń porównywano z wynikami analiz mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny o stężeniu 2 mg/ml przygotowanych w dniu analizy. Z przeprowadzonych badań wynika, że roztwór mieszaniny izomerów metoksyaniliny przechowywany w szczelnie zamkniętych naczyniach w chłodziarce jest trwały przez okres co najmniej trzydziestu dni.

Celem zbadania trwałości próbek 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny pobranych rurkami wypełnionymi Amberlitem XAD (150/75 mg) przygotowano trzy serie po sześć rurek, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny o stężeniach: 0,1; 0,5 i 2,0 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika rurki szczelnie zamykano i umieszczano w hermetycznych pojemnikach w chłodziar-

ce. Po pięciu, dziesięciu, dwudziestu i trzydziestu dniach przechowywania, pierwszą warstwę Amberlitu przenoszono do próbek i desorbowano, stosując 5 ml acetonitrylu. Eluaty zbierano do kolb miarowych o pojemności 5 ml, uzupełniano do kreski, a następnie, po wymieszaniu, poddawano reakcji z Fmoc Cl. Roztwory poreakcyjne przenoszono po ostudzeniu do wial o pojemności 1 ml i poddawano analizie chromatograficznej. Wyniki oznaczeń porównywano z wynikami analiz eluatów 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny przygotowanych w dniu analizy.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że próbki 4-metoksyaniliny pobrane na żywicę Amberlite XAD-2 i przechowywane w hermetycznych pojemnikach w chłodziarce są nietrwałe. Już po dziesięciu dniach przechowywania, zawartość tego związku dla stężenia 10 µg/5 ml spada do 32% początkowej wartości, a dla pozostałych stężeń (50 i 200 µg/5 ml) odpowiednio do: 52 i 77%. W przypadku 2-metoksyaniliny nie zaobserwowano strat oznaczanego związku, związanych z okresem przechowywania. Po trzydziestu dniach stwierdzono na Amberlicie XAD-2 odpowiednio dla analizowanych stężeń (10; 50;

200 µg/5 ml) 100; 91 i 96% pierwotnej ilości analitu.

Walidacja

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

Wyznaczono następujące parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy metody wynosi $1/10 \div 2$ proponowanej wartości NDS
- krzywe kalibracyjne charakteryzują się dużą wartością współczynnika korelacji ($r = 0,999$), co świadczy o liniowości wskazań detektora chromatografu ciekowego w badanym zakresie stężeń
- wyznaczono: granice wykrywalności i oznaczalności 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny, całkowitą precyzję i względną niepewność całkowitą metody.

Walidacja metody potwierdziła jej przydatność do zamierzonego zastosowania. Wyznaczone parametry walidacyjne zawarto w procedurze analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano czułą i selektywną metodę oznaczania izomerów metoksyaniliny w powietrzu na stanowiskach pracy z wykorzystaniem techniki chromatografii ciekowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS) i/lub spektrofluorymetryczną (FLD).

Ustalono sposób pobierania próbek powietrza:

- rurki sorpcyjne wypełnione dwiema warstwami (150/75 mg) żywicy Amberlite XAD-2 zapewniają ilościowe wyodrębnienie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny z badanego powietrza
- próbki przechowywane w chłodziarce są nietrwałe, dlatego po pobraniu ich należy poddać je ekstrakcji i przechowywać w chłodziarce w postaci roztworu.

Dobrano parametry chromatograficznego oznaczania:

- do oznaczania wytypowano kolumnę Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm eluowaną mieszaniną acetonitrylu i wody (62: 38), co pozwala na selektywne oznaczanie wszystkich izomerów metoksyaniliny
- oznaczanie prowadzi się po przekształceniu izomerów metoksyaniliny w pochodne za pomocą chloromrówczanu 9-fluorenylometylu (Fmoc Cl).

Opracowana metoda oznaczania izomerów metoksyaniliny może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy i stacje sanitarno-epidemiologiczne do wykonywania pomia-

rów stężeń tych substancji w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia pracowników i oceny stwarzanego przez te związki ryzyka zawodowego.

PIŚMIENNICTWO

- Asthana A.* i in. (2000) Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 895, 197–203.
- Coppex L.* (2000) Derivatives for HPLC analysis. Diploma thesis. Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Geneva [http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/22084/HPCL_Derivatization_Literature.pdf].
- Dobecki M.* (2004) Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy. Wyd. 3., popr. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2013a). *o*-Anisidine [http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~Yx0wtT:1].
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (HSDB) (2013b). *p*-Anisidine [http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~JgDcFL:1].
- IARC (1999) *ortho*-Anisidine. IARC. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 73, 49–58. [http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/volume73.pdf].
- Lizier T.M., Zononi M.V.B.* (2012) Effect of ionic liquid on the determination of aromatic amines as contaminants in hair dyes by liquid chromatography coupled to electrochemical detection molecules 17, 7961–7979.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health. Analytical methods in adobe acrobat format (2003) Anisidine method 2514 [http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/2514.pdf].
- Jambor A., Molnar-Perl I.* (2009) Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography. Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *J. Chromatogr. A.* 1216, 6218–6223.
- Lozanov V.* i in. (2007) Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile. *J. Chromatogr. B.* 860, 92–97.
- Molnar-Perl I.* (2011) Advancement in the derivatizations of the amino groups with the *o*-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *J. Chromatogr. B.* 879, 1241–1269.
- Paseiro-Cerrato R.* i in. (2011) Analytical method for the simultaneous determination of polyfunctional amines used as monomers in the manufacture of food packaging materials. *J. Chromatogr. A.* 1218, 7105–9.
- PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.
- Rozporządzenie ministra pracy i polityki społecznej z dnia 19.11.2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU nr 217, poz. 1833.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE).
- EPA, Environmental Protection Agency (US), (2007) Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry. Method 8270D. Revision 4 [http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf].
- EPA, Environmental Protection Agency (US), (1989) Semivolatile organic compounds by isotope dilution GCMS. Method 1625C. [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_11_06_method_s_method_1625c.pdf].
- Wood G.O., Anderson R.G.* (1975) Personal air sampling for vapors of aniline compounds. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 36(7), 538–48.
- Zhao X, Suo Y.* (2008) Analysis of primary aromatic amines using precolumn derivatization by HPLC fluorescence detection and online MS identification. *J. Sep. Sci.* 31, 646–658.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA METOKSYANILINY

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się do oznaczania 2-metoksyaniliny (nr CAS: 90-04-0) i (lub) 4-metoksyaniliny (nr CAS: 104-94-9) w powietrzu na stanowiskach pracy. Metodę stosuje się podczas przeprowadzania kontroli warunków sanitarnohigienicznych. W przypadku współwystępowania w badanym powietrzu innych związków organicznych należy sprawdzić, czy w warunkach wykonania oznaczania nie posiadają one takich samych czasów retencji jak izomery metoksyaniliny.

Najmniejsze stężenie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonywania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,025 mg/m³ powietrza.

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 zatrzymaniu 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny na żywicy Amberlite XAD-2, ekstrakcji acetonitrylem zatrzymanych związków, reakcji 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny z chloromrówczanem 9-fluorenylometylu oraz oznaczaniu powstałych w wyniku reakcji pochodnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

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

4.2. Dokładność ważenia

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

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji wzorcowych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich unieszkodliwianiem.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Acetonitryl

Stosować acetonitryl o czystości do HPLC.

5.2. Amberlite XAD-2

Stosować żywicę Amberlite XAD-2 lub jej odpowiednik.

5.3. Tetraboran sodowy dziesięciowodny (boraks) (Na₂B₄O₇·10 H₂O)

Stosować według punktu 4.

5.4. Kwas borowy

Stosować według punktu 4.

5.5. Chlorek sodu (NaCl)

Stosować według punktu 4.

5.6. Chloromrówczan 9-fluorenylometylu (FMOC Cl)

Stosować według punktu 4.

5.7. 2-Metoksyanilina

Stosować 2-metoksyanilinę o czystości $\geq 99\%$.

5.8. 4-Metoksyanilina

Stosować 4-metoksyanilinę o czystości $\geq 99\%$.

5.9. Roztwór acetonitrylu 62-procentowy

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzyć 6,2 ml acetonitrylu wg punktu 5.1. i uzupełnić wodą wg punktu 5.16. do kreski.

5.10. Roztwór buforu boranowego – pH 8,5

Odważyć 12,404 g kwasu borowego wg punktu 5.4. oraz 2,892 g chlorku sodu wg punktu 5.5.,

przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, rozpuścić w wodzie wg pktu 5.13. i uzupełnić kolbę do kreski.

Odważyć 19,108 g tetraboranu disodu wg punktu 5.3., przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, rozpuścić w wodzie wg punktu 5.16., a następnie uzupełnić kolbę do kreski wodą.

Przygotowane roztwory mieszać ze sobą w stosunku 1:1 (v: v). Stężenie tak przygotowanego buforu boranowego wynosi 0,2 mol/l.

5.11. Roztwór chloromrówczanu 9-fluorenylometylu

Odważyć dokładnie 0,388 g chloromrówczanu 9-fluorenylometylu wg punktu 5.6., przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 ml i rozpuścić w acetonitrylu wg punktu 5.1. Stężenie tego związku w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,015 mol/l.

5.12. Roztwór wzorcowy 2-metoksyaniliny

Do kolby miarowej o pojemności 25 ml odważyć dokładnie 101 mg wzorca 2-metoksyaniliny wg punktu 5.7. i rozpuścić w acetonitrylu wg punktu 5.1. Stężenie 2-metoksyaniliny w tak przygotowanym roztworze wynosi 4 mg/ml.

5.13. Roztwór wzorcowy 4-metoksyaniliny

Odważyć 101,0 mg 4-metoksyaniliny wg punktu 5.8., przenieść do kolby miarowej o pojemności 25 ml i rozpuścić w acetonitrylu wg punktu 5.1. Stężenie 4-metoksyaniliny w tak przygotowanym roztworze wynosi 4 mg/ml.

5.14. Roztwór wzorcowy mieszaniny 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny

Do kolby miarowej o pojemności 25 ml odmierzyć po 12,5 ml roztworów wzorcowych wg punktów 5.12. i 5.13. Stężenie obu związków w tak przygotowanej mieszaninie wynosi 2 mg/ml.

5.15. Roztwory wzorcowe robocze 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny

Do siedmiu kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć pipetą wg punktu 6.5. i 6.6.: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego mieszaniny wg punktu 5.14. Kolby uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.1. Stężenia obu związków w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 i 2,0 mg/ml.

5.16. Woda do HPLC

Stosować wodę o czystości do HPLC.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie oznaczeń przy długości fali 265 nm lub z detektorem spektrofluorymetrycznym umożliwiającym wykonanie oznaczeń przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 265 i 360 nm.

6.2. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności: 10; 25 i 1000 ml.

6.3. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną stalową o długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 2 mm wypełnioną żelazem krzemionkowym modyfikowanym grupami C-18 o średnicy ziaren 4 μ m lub inną kolumnę analityczną zapewniającą możliwość selektywnego oznaczenia izomerów metoksyaniliny.

6.4. Naczynka

Stosować naczynka kapslowane lub zakręcane, z uszczelkami z gumy silikonowej pokrytej folią teflonową, umożliwiające pobieranie zawartości mikrostrzykawką bez otwierania naczynka o pojemności około 1 ÷ 2 ml.

6.5. Pipety automatyczne

Stosować pipety automatyczne nastawne o pojemności: 0,010 ÷ 0,1 ml i 0,1 ÷ 1 ml.

6.6. Pipety szklane

Stosować pipety szklane o pojemności: 1; 2,5 i 5 ml.

6.7. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą z przepływomierzem umożliwiającą pobieranie powietrza ze stałym strumieniem objętości według punktu 8.

6.8. Rurki pochłaniające

Stosować rurki szklane o długości 110 mm i średnicy 8 mm z przewężeniem na jednym końcu, zamykane kapturkami z tworzywa sztucznego, np. polietylenu, polichlorku winylu lub dostępne w handlu rurki równoważne.

7. Przygotowanie rurek pochłaniających

W rurce pochłaniającej wg punktu 6.8. umieścić na przewężeniu, przegródkę z waty szklanej, wsypać 75 mg sorbentu wg punktu 5.2., umieścić na nim przegródkę, następnie wsypać 150 mg sorbentu i ponownie umieścić przegródkę. Natychmiast po napełnieniu rurkę zamknąć zatyczkami. Dopuszcza się stosowanie także gotowych rurek pochłaniających, dostępnych w handlu.

8. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-07. W miejscu pobierania próbki zdjąć zatyczki z rurki pochłaniającej według punktu 7., rurkę umocować w pozycji pionowej i połączyć z urządzeniem zasysającym od strony krótszej warstwy sorbentu. Przepuścić do 200 l powietrza ze stałym strumieniem objętości do 60 l/h. Z uwagi na nietrwałość 4-metoksyaniliny, bezpośrednio po pobraniu próbki

przenieść każdą z warstw żywicy XAD-2 do oddzielnej próbki i zalać 5 ml acetonitrylu wg punktu 5.1. Próbki wytrząsać przez 15 min. Probówki z wyekstrahowanymi substancjami szczelnie zamknąć i przechowywać do czasu analizy w lodówce. Pobrane w ten sposób próbki powietrza przechowywane w szczelnie zamkniętych pojemnikach są trwałe przez okres co najmniej 30 dni.

9. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywne oznaczanie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.3., oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1.

Podane warunki należy traktować jako warunki przykładowe. W przypadku współwystępowania substancji interferujących, należy tak dobrać warunki rozdziału chromatograficznego, aby zapewnić selektywne oznaczenie 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny.

Tabela 1.
Warunki pracy chromatografu cieczowego

Kolumna analityczna	Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm, uziarnienie 4 µm
Faza ruchoma	acetonitryl: woda 62: 38
Program	izokratycznie
Strumień objętości	0,3 ml/min
Temperatura kolumny	35 °C
Długość fali analitycznej	265 nm (UV-VIS)
Długość fali wzbudzenia i emisji	$\lambda_{wzb} = 265 \text{ nm}; \lambda_{em} = 360 \text{ nm}$
Objętość próbki	10 µl

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na siedem rurek szklanych wg punktu 7. nanieść do dłuższej warstwy sorbentu pipetą automatyczną po 0,1 ml roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 5.15. Po wysuszeniu przenieść dłuższą warstwę żywicy XAD-2 do próbki szklanej, dodać 5 ml acetonitrylu wg punktu 5.1. i ekstrahować na wytrząsarce przez

15 min. Do czystych próbek przenieść po 0,25 ml otrzymanych ekstraktów i dodać 0,25 ml buforu boranowego wg punktu 5.10. 0,25 ml roztworu chloromrówczanu 9-fluorenylometylu wg punktu 5.11. i 0,25 ml 62-procentowego roztworu acetonitrylu wg punktu 5.9. Probówki szczelnie zamknąć, wymieszać zawartość i pozostawić przez 40 min w temperaturze 40 °C. Po tym czasie roztwory ochłodzić do temperatury pokojowej i poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić

krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilości 2-metoksyaniliny i 4-metoksyaniliny nanesione na Amberlite XAD-2 (w miligramach), a na osi rzędnych – odpowiadające im powierzchnie pików wg wskazań integratora.

Dopuszcza się korzystanie z automatycznego wzorcowania i generacji raportów integratorów lub komputerowych stacji akwizycji danych, zgodnie z ich instrukcjami obsługi.

11. Wykonanie oznaczania

Do naczynek wg punktu 6.4. pobrać po 0,25 ml otrzymanych ekstraktów pobranych próbek powietrza i dodać 0,25 ml buforu boranowego wg punktu 5.10. 0,25 ml roztworu chloromrówczanu 9-fluorenylometylu wg punktu 5.11. i 0,25 ml 62-procentowego roztworu acetonitrylu wg punktu 5.9. Wiały szczelnie zamknąć, wstrząsnąć ich zawartością i pozostawić na 40 min w temperaturze 40 °C. Po tym czasie próbki ochłodzić i poddać analizie chromatograficznej. Zawartość oznaczanych substancji w ekstraktach drugich warstw żywicy XAD-2 nie powinna przekraczać 10% zawartości tych związków oznaczo-

nych w pierwszej warstwie, w przeciwnym razie wynik należy traktować jako orientacyjny.

Próbki, których wartości pola powierzchni (wysokości) pików przekraczają wartości pola powierzchni (wysokości) pików wzorca o najwyższym stężeniu, należy rozcieńczyć acetonitrylem. Dodatkowo rozcieńczenie należy uwzględnić w obliczeniach.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie metoksyaniliny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{m_1 + m_2}{V}$$

w którym:

m_1 – zawartość metoksyaniliny (suma izomerów) w pierwszej warstwie, odczytana z krzywych wzorcowych, w miligramach,

m_2 – zawartość metoksyaniliny (suma izomerów) w drugiej warstwie, odczytana z krzywych wzorcowych, w miligramach,

V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując chromatograf cieczowy firmy Waters model Breeze wyposażony w automatyczny dozownik próbek, detektor spektrofotometryczny Waters 2487 i spektrofluorymetryczny HP 1046A, kolumnę analityczną Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 150 x 2 mm o uziarnieniu 4 μm oraz komputer z oprogramowaniem sterującym i zbierającym dane.

Na podstawie przeprowadzonych badań otrzymano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,001 ÷ 0,04 mg/ml
0,025 ÷ 1 mg/m³ (dla próbki powietrza 200 l)

- granica wykrywalności,

X_{gw}	0,02 $\mu\text{g/ml}$ (FLD)
	0,03 $\mu\text{g/ml}$ (UV-VIS)
- granica oznaczania ilościowego, X_{ozn}

	0,07 $\mu\text{g/ml}$ (FLD)
	0,1 $\mu\text{g/ml}$ (UV-VIS)
- współczynnik korelacji charakteryzujący liniowość krzywych wzorcowych, $r = 0,999$
- całkowita precyzja badania, V_c

	6,4% (FLD),
	6,3% (UV-VIS)
- niepewność całkowita metody 13,7%.