

Benzydyna

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

Benzidine

Determination in workplace air¹

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, Warszawa

Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warsaw, Poland

Numer CAS / CAS Number: 92-87-5

Streszczenie

Benzydyna to białe krystaliczne ciało stałe stosowane dawniej do produkcji barwników, a obecnie w analizie chemicznej. Benzydyna może powodować nowotwory pęcherza moczowego u ludzi. Celem prac badawczych było opracowanie metody oznaczania benzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy, która umożliwi oznaczanie jej stężeń na jak najniższym poziomie. Metoda polega na: chemisorpcji benzydyny na filtrze z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), ekstrakcji disiarczaniu benzydyny wodą i roztworem wodorotlenku sodu, a po ekstrakcji do fazy stałej (SPE) eluowaniu benzydyny z kolumnki do SPE przy użyciu 1 ml metanolu. Otrzymany roztwór jest analizowany chromatograficznie. Badania wykonano z zastosowaniem chromatografu cieczowego (HPLC) serii 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem fluorescencyjnym (FLD). Oznaczenia prowadzono z zastosowaniem kolumny Ultra C18 (250 × 4,6 mm, o uziarnieniu 5 µm). Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Metoda umożliwia oznaczanie benzydyny w powietrzu środowiska pracy w zakresie stężeń 0,1 ÷ 2 µg/m³. Granica oznaczalności LOQ wynosi 0,25 ng/m³. Całkowita precyzja badania wyniosła 5,36%, a niepewność rozszerzona metody 23%. Opisywana metoda umożliwia selektywne oznaczanie benzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy, w obecności większości substancji, które nie wykazują zjawiska fluorescencji, a także w obecności: bifenylu-4-aminy, 1-naftyloaminy i 2-naftyloaminy. Metoda oznaczania benzydyny została przedstawiona 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.

Słowa kluczowe: benzydyna, substancja rakotwórcza, metoda analityczna, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2021-2022 w zakresie zadań służb państwowych ze środków Ministerstwa Rozwoju, Pracy i Technologii. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

This paper has been based on the results of a research task carried out within the scope of the fifth stage of the National Programme “Improvement of safety and working conditions” partly supported in 2021–2022 – within the scope of state services – by the Ministry of Economic Development, Labour and Technology.

The Central Institute for Labour Protection – National Research Institute is the Programme’s main co-ordinator.

Abstract

Benzidine is a white, crystalline solid. In the past, it was used mainly for the production of dyes, and nowadays in chemical analysis. Benzidine can cause bladder cancer to humans. The aim of this study was to develop a method for determining benzidine in workplace air, which will make it possible to determine its concentrations at the lowest possible level. The method is based on the chemisorption of benzidine on a glass fiber filter treated with sulphuric acid(VI), extraction of benzidine disulphate with water and sodium hydroxide solution, and after extraction to the solid phase (SPE), benzidine is eluted from the SPE cartridge using 1 mL of methanol. The obtained solution is analyzed chromatographically. The tests were performed using a liquid chromatograph (HPLC) 1200 series of Agilent Technologies with a fluorescence detector (FLD). Determinations were performed using an Ultra C18 column (250 × 4.6 mm, dp = 5 µm). The procedure was validated according to Standard No. EN 482. The method can be used to determine benzidine in workplace air in the concentration range from 0.1 to 2 µg/m³. The limit of quantification (LOQ) is 0.25 ng/m³. The overall accuracy of the method was 5.36% and its relative total uncertainty was 23%. This method makes it possible to selectively determine benzidine in workplace air in the presence of most substances that do not show fluorescence, and in the presence of: biphenyl-4-amine, 1-naphthylamine and 2-naphthylamine, which show fluorescence. The method of determining benzidine 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.

Keywords: benzidine, carcinogens, determination method, workplace air, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE / INTRODUCTION

Benzydyna to białe krystaliczne ciało stałe, ciemniejące na powietrzu i pod wpływem światła. Podczas ogrzewania powyżej temperatury 100 °C rozkłada się z wydzieleniem silnie toksycznych par i aerozoli. Benzydyna rozpuszcza się w: etanolu, eterze dietylowym i sulfotlenku dimetylu. Masa molowa benzydyny wynosi 184,23 g/mol, a jej temperatury topnienia i wrzenia wynoszą odpowiednio 128 i 402 °C. Prężność par benzydyny w 25 °C wynosi 0,067 Pa (CHEMINFO 2007; ChemPył 2020; GESTIS 2011).

Benzydyna nie występuje naturalnie w przyrodzie, otrzymuje się ją z nitrobenzenu lub 1,2-difenylohydrazyny, jednak jej produkcja, jak i stosowanie w wielu krajach zostały znacznie ograniczone lub zakazane ze względu na silny związek między narażeniem na benzydynam a zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka pęcherza moczowego u ludzi. W Polsce zakazane są produkcja, obrót lub stosowanie benzydyny i jej soli jako substancji w postaci własnej lub substancji wchodzącej w skład innej substancji lub w mieszaninach w stężeniu równym lub większym niż 0,1% masy. Pod pewnymi warunkami produkcja, obrót lub stosowanie benzydyny są możliwe do celów badań naukowych i rozwojowych lub do przeprowadzania analiz chemicznych (Obwieszczenie... 2019).

Benzidine is a white crystalline solid that darkens in the air and when exposed to light. When heated above 100°C, it decomposes with the release of highly toxic vapours and aerosols. Benzidine dissolves in ethanol, diethyl ether and dimethyl sulfoxide. The molar mass of benzidine is 184.23 g/mol and its melting and boiling points are 128 and 402 °C, respectively. The vapour pressure of benzidine at 25 °C is 0.067 Pa (CHEMINFO 2007; ChemPył 2020; GESTIS 2011).

Benzidine does not occur naturally in nature. It is obtained from nitrobenzene or 1,2-diphenylhydrazine, but its production and use in many countries have been significantly restricted or prohibited due to the strong link between exposure to benzidine and increased risk of bladder cancer in humans. In Poland, the production, marketing or use of benzidine and its salts is prohibited as a substance on its own or as a component of another substance or in mixtures in a concentration equal to or greater than 0.1% by weight. Under certain conditions, the production, marketing or use of benzidine is possible for research and development purposes or for chemical analyses (Notice... 2019).

In the past, benzidine was used mainly for the production of dyes, in particular azo dyes, which

W przeszłości benzydynam wykorzystywano głównie do produkcji barwników, zwłaszcza barwników azowych, które stosowano w przemyśle skórzanym, włókienniczym i papierniczym. Stosowano ją również do produkcji folii z tworzyw sztucznych oraz w syntezie organicznej. Zdolność benzydyny do reakcji z wieloma kationami, anionami i substancjami organicznymi, takimi jak czynniki utleniające i krew, jest wykorzystywana do celów analitycznych i diagnostycznych (IARC 2010; PubChem 2011; Schwenecke, Mayer 2005). W kryminalistyce stosowana jest do wykrywania plam krwi, a w analizie chemicznej do wykrywania metali ciężkich (np. manganu).

Benzydyna wchłania się do organizmu głównie przez układ oddechowy i skórę. Po kilkugodzinnym narażeniu na bardzo duże stężenia benzydyny mogą wystąpić: ból głowy, duszność, sinoniebieskie zabarwienie warg, paznokci i skóry. Skażenie skóry wywołuje jej zaczerwienienie, a po przedłużonym kontakcie sinoniebieskie zabarwienie. Skażenie oczu pyłem może wywołać: łzawienie, ból i zaczerwienienie spojówek z ryzykiem uszkodzenia rogówki (ChemPył 2020).

Obecnie narażenie zawodowe na benzydynam może wystąpić głównie podczas laboratoryjnego kontaktu z tą substancją. Już od lat 50. ubiegłego wieku wiadomo, że benzydyna może powodować nowotwory pęcherza moczowego (Case i in. 1954; IARC 1972; Scott 1952). Według IARC benzydyna jest substancją o udowodnionym działaniu rakotwórczym (grupa 1), (IARC 1982; 1987; 2010; 2012). W Unii Europejskiej benzydynam sklasyfikowano jako substancję rakotwórczą kategorii zagrożenia 1A (stężenie graniczne $C \geq 0,01\%$), toksyczną i stwarzającą zagrożenie dla środowiska wodnego (kat. 1). Substancji tej przypisano następujące zwroty określające rodzaj zagrożenia (Rozporządzenie... 2018):

- H350: może powodować raka.
- H302: działa szkodliwie po połknięciu.
- H410: działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Obowiązująca w Polsce wartość normatywu higienicznego – najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla benzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy wynosi 0 mg/m^3 . Benzzydyna dodatkowo ma oznakowanie notacją „skóra” informujące, że wchłanianie substancji przez skórę może być tak samo istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową.

were used in the leather, textile and paper industries. It was also used in the manufacture of plastic foils and organic synthesis. The ability of benzidine to react with multiple cations, anions and organic substances, such as oxidising agents and blood, is leveraged for analytical and diagnostic purposes (IARC 2010; PubChem 2011; Schwenecke, Mayer 2005). In crime detection, it is used to detect blood spots, and in chemical analysis, it is used to detect heavy metals (e.g. manganese).

Benzidine enters the body mainly through respiratory system and the skin. After several hours of exposure to very high concentrations of benzidine, headaches, shortness of breath and cyanosis of the lips, nails and skin may occur. Contamination of the skin causes redness and, after prolonged contact, cyanosis. Contamination of the eyes with dust may cause: lacrimation, pain and redness of the conjunctiva with the risk of corneal damage (ChemPył 2020).

Currently, occupational exposure to benzidine may occur primarily during laboratory exposure to the substance. It has been known since the 1950s that benzidine may cause bladder cancer (Case et al. 1954; IARC 1972; Scott 1952). According to the IARC, benzidine is a proven carcinogenic substance (group 1), (IARC 1982; 1987; 2010; 2012). In the European Union, benzidine is classified as a category 1A carcinogenic substance (concentration limit $C \geq 0.01\%$), toxic and hazardous to the aquatic environment (cat. 1). The following hazard statements have been assigned to this substance (Regulation... 2018):

- H350: may cause cancer.
- H302: harmful if swallowed.
- H410: very toxic to aquatic life with long-lasting effects.

The hygiene standard permissible in Poland – the threshold limit value (TLV) for benzidine in workplace air is 0 mg/m^3 . Benzidine is additionally labelled with the notation ‘skin’ indicating that dermal absorption may be as significant as inhalation exposure.

Dostępne metody oznaczania benzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy przedstawiono w tabeli 1.

The available methods for determining benzidine in workplace air are presented in Table 1.

Tabela 1. Metody oznaczania benzydyny w powietrzu środowiska pracy

Table 1. Methods for determining benzidine in the air of the working environment

Lp. No	Pobieranie próbek powietrza Collection of air samples	Przygotowanie próbek do analizy Preparation of samples for analysis	Sposób analizy Method of analysis	Granica wykrywalności, LOD Limit of detection (LOD)	Granica oznaczalności, LOQ Limit of quantification (LOQ)	Zakres pomiarowy / oznaczalność Measurement range / limit of determination	Piśmiennictwo References
1	filtr z włókna szklanego i żel krzemionkowy glass fibre filter and silica gel	ekstrakcja trietyloaminą w metanolu extraction with triethylamine in methanol	HPLC/UV, faza metanol: woda (60: 40) HPLC/UV, methanol phase: water (60:40)	3 µg/m ³	bd. NDA	bd. NDA	<i>Morales</i> i in. 1979
2	filtr celulozowy cellulose filter	ekstrakcja roztworem węgla(VI) sodu extraction with sodium (VI) carbonate solution	LC/UV, faza chloroform/ heksan LC/UV, chloroform/ hexane phase	bd. NDA	bd. NDA	bd. NDA	<i>Krajewski</i> i in. 1979
3	sączki Whatman 4 Whatman 4 filters	ekstrakcja kwasem solnym, reakcja z chloroaminą, ekstrakcja chloroformem extraction with hydrochloric acid, reaction with chloramine, extraction with chloroform	spektrofotometr, λ = 445 nm Spectrophotometer, λ = 445 nm	bd. NDA	bd. NDA	2 µg/m ³	PN-Z-04145-02:1985
4	sączki Whatman 4 Whatman 4 filters	ekstrakcja roztworem węgla(VI) sodu, ekstrakcja chloroformem extraction with sodium (VI) carbonate solution, extraction with chloroform	HPLC/UV	bd. NDA	bd. NDA	0,7 µg/m ³	PN-Z-04145-03:1985
5	2 filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym 2 glass fibre filters coated with sulphuric acid	ekstrakcja wodą, zmiana środowiska na zasadowe, ekstrakcja toluenem, derywatyzacja HFAA extraction with water, environment changed to alkaline, extraction with toluene, HFAA derivatisation	GC/ECD	bd. NDA	31 ng/m ³ dla próbki powietrza 100 l 31 ng/m ³ for air sample 100 l	bd. NDA	<i>Elskamp</i> 1989; metoda OSHA 65 / OSHA 65 method

cd. tab. 1. / cont. tab. 1

Lp. No	Pobieranie próbek powietrza Collection of air samples	Przygotowanie próbek do analizy Preparation of samples for analysis	Sposób analizy Method of analysis	Granica wykrywalności, LOD Limit of detection (LOD)	Granica oznaczalności, LOQ Limit of quantification (LOQ)	Zakres pomiarowy / oznaczalność Measurement range / limit of determination	Piśmiennictwo References
6	filtr z włókna szklanego glass fibre filter	ekstrakcja roztworem trietyloaminy w metanolu (0,17%; v/v) extraction with triethylamine solution in methanol (0.17%; v/v)	HPLC/UV	bd. NDA	bd. / NDA	4 ÷ 200 µg/m ³ dla próbki powietrza 50 l 4÷200 µg/m ³ for air sample of 50 l	Seymour 1994

Objaśnienie: / Explanation:

bd. – brak danych / NDA – no data available.

Celem prac badawczych było opracowanie metody oznaczania benzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy w możliwie jak najniższym zakresie stężeń, ponieważ obowiązująca wartość NDS dla benzydyny wynosi 0 mg/m³.

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

The purpose of the research was to develop a method for determining benzidine in workplace air in the lowest possible concentration range, as the applicable TLV for benzidine is 0 mg/m³.

The subject matter of the article covers occupational health and safety issues, which are the subject of health sciences and environmental engineering studies.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA / EXPERIMENTAL PART

Metoda badań

Na podstawie danych z piśmiennictwa zdecydowano, że benzydyna będzie pobierana na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), (Elskamp 1989). Liczne doniesienia literaturowe (w tym metoda OSHA 65) zalecają ten sposób pobierania próbek powietrza zawierających aminy aromatyczne w celu poprawy trwałości próbek, ponieważ sole amin są bardziej stabilne niż sama amina (Elskamp 1989; Jeżewska, Buszewski 2010; 2011). Aminy wykazują właściwości zasadowe i łatwo ulegają działaniu kwasów nieorganicznych, tworząc sole. Benzydyna bardzo dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak metanol czy toluen, a bardzo słabo w wodzie, podczas gdy sole benzydyny bardzo dobrze rozpuszczają się w wodzie. Wykorzystując tę właściwość, zdecydowano, że disiarczan benzydyny będzie wmywany z filtra

Study methodology

On the basis of the data from the literature, it was decided that benzidine would be collected on glass fibre filters coated with sulphuric acid (Elskamp 1989). Numerous literature reports (including the OSHA 65 method) recommend this method of sampling air containing aromatic amines to improve sample persistence, as amine salts are more stable than amine alone (Elskamp 1989; Jeżewska, Buszewski 2010; 2011). Amines have alkaline properties and are easily exposed to inorganic acids to form salts. Benzidine dissolves very well in organic solvents such as methanol and toluene, and very poorly in water, while the salts of benzidine dissolve very well in water. Using this characteristic, it was decided that benzidine disulfate would be washed out of the filter with water and with the use of sodium hydroxide solution returned back to benzidine. Then the

wodą i przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu przeprowadzany z powrotem w benzydynie. Następnie próbka będzie poddana ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnkach wypełnionych kopolimerem *N*-winylopirolidonu i diwinylobenzenu (Oasis HLB) w celu wzbogacenia analitu i wymiany rozpuszczalnika na metanol (Jeżewska, Buszewski 2010; 2011). Roztwór benzydyny w metanolu będzie oznaczany chromatograficznie.

Zakres pomiarowy wg PN-EN 482 powinien obejmować zakres stężeń odpowiadający wartościom normatywu higienicznego oznaczanego składnika w powietrzu $0,1 \div 2$ wartości NDS. W przypadku benzydyny, której wartość NDS = 0 mg/m^3 , nie ma możliwości wyznaczenia takiego zakresu, dlatego przy doborze zakresu pomiarowego została przyjęta wartość NDS ustalona dla innej rakotwórczej aminy aromatycznej kat. zagrożenia 1A – bifenilo-4-aminy, dla której NDS ustalono na poziomie $1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$. W takim przypadku założony zakres pomiarowy dla benzydyny wynosi $0,1 \div 2 \text{ } \mu\text{g/m}^3$.

Aparatura

Do wykonania oznaczeń stosowano chromatograf cieczowy (Agilent Technologies, Niemcy) serii 1200 z detektorem fluorescencyjnym (FLD) sprzężonym on-line oraz automatycznym dozownikiem próbek. Do sterowania procesem, oznaczania i zbierania danych korzystano z oprogramowania ChemStation. W badaniu stosowano kolumnę Ultra C18 o długości 25 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, o uziarnieniu $5 \text{ } \mu\text{m}$, z przedkolumną o wymiarach: $10 \times 4,0 \text{ mm}$ (Restek, USA).

Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory typu Gilian LFS i GilAir plus (Sensidyne, USA).

Do przeprowadzenia ekstrakcji do fazy stałej (SPE) – zestaw próżniowy do SPE firmy Supelco i pompę próżniową firmy Laboport.

Do przeprowadzenia ekstrakcji benzydyny z filtrów korzystano z wytrząsarki mechanicznej WL-2000 (JWElectronic, Polska). Wzorce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA). Próbkę przechowywano w eksykatorze szafkowym serii EKS (WSL, Polska), roztwory wzorcowe przechowywano w chłodziarce ARDO CO23B-2H (Merloni, Polska).

sample would be extracted to the solid phase (SPE) on cartridges filled with *N*-vinylpyrrolidone and divinylbenzene copolymer (Oasis HLB) in order to enrich the analyte and replace the solvent with methanol (Jeżewska, Buszewski 2010; 2011). The benzidine solution in methanol would be determined chromatographically.

The measurement range according to Standard No. PN-EN 482 should include a range of concentrations corresponding to the hygienic normative values of the identified component in air of $0.1 \div 2$ TLVs. For benzidine, whose TLV = 0 mg/m^3 , it is not possible to determine such a range; therefore, when selecting the measurement range, the TLV value determined for another category 1A carcinogenic aromatic amine, i.e. biphenyl-4-amine, was adopted, for which the TLV was determined at $1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$. In this case, the assumed measurement range for benzidine is $0.1 \div 2 \text{ } \mu\text{g/m}^3$.

Apparatus

A 1200 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Germany) with an online coupled fluorescence detector (FLD) and an automatic sample dispenser were used to perform the determinations. ChemStation software was used to control the process and determine and collect data. An Ultra C18 column with a length of 25 cm and an internal diameter of 4.6 mm with a grain size of $5 \text{ } \mu\text{m}$ was used in the test, together with a pre-column with dimensions of: $10 \times 4.0 \text{ mm}$ (Restek, USA).

For air sampling, Gilian LFS and GilAir plus type aspirators (Sensidyne, USA) were used.

An SPE vacuum set by Supelco and a Laboport vacuum pump were used for solid phase extraction (SPE).

Extraction of benzidine from the filters was performed using a WL-2000 mechanical shaker (JWElectronic, Poland). The standards were weighed on a Sartorius TE214S analytical balance (Sartorius Corporation, USA). The samples were stored in a cabinet desiccator of the EKS series (WSL, Poland); the standard solutions were stored in an ARDO CO23B-2H refrigerator (Merloni, Poland).

Reagents and materials

The tests used the following reagents of at least analytical grade: benzidine, 2-naphthylamine,

Odczynniki i materiały

W badaniach stosowano następujące odczynniki o czystości co najmniej cz.d.a.: benzydyna, 2-naftyloamina, 1-naftyloamina (Sigma-Aldrich, Niemcy), bifenylo-4-amina, kwas octowy (Riedel-de Haën), metanol, acetonitryl (Honeywell, USA), kwas siarkowy, wodorotlenek sodu (POCH, Polska). Stosowano także wodę o wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA).

Ponadto stosowano: filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm Whatman GF/A, (Whatman, UK) w oprawkach o średnicy 37 mm (SKC, USA), kolumny do SPE wypełnione 30-miligramową warstwą kopolimeru *N*-winylopirolidonu i diwinylobenzenu – Oasis HLB (1 ml) firmy Waters, a także szkło laboratoryjne oraz strzykawki do cieczy.

1-naphthylamine (Sigma-Aldrich, Germany), biphenyl-4-amine, acetic acid (Riedel-de Haën), methanol, acetonitrile (Honeywell, USA), sulphuric acid, sodium hydroxide (POCH, Poland). High purity water obtained from Milli-Q apparatus (Millipore, USA) was also used.

In addition, the following were used: glass fibre filters with a diameter of 37 mm Whatman GF/A (Whatman, UK) in holders with a diameter of 37 mm (SKC, USA), SPE cartridges filled with 30 milligrams of *N*-vinylpyrrolidone and divinylbenzene copolymer – Oasis HLB (1 ml) by Waters, as well as laboratory glassware and liquid syringes.

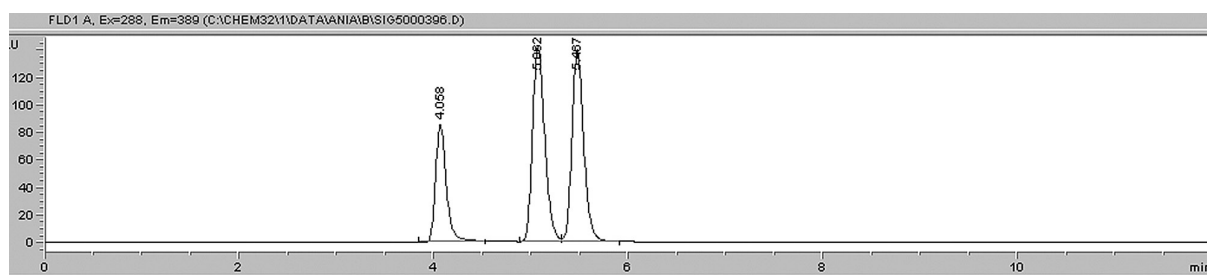
WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE / TEST RESULTS AND THEIR REVIEW

Ustalenie warunków oznaczania chromatograficznego

W wyniku wstępnych badań ustalono, że benzydyna będzie oznaczana z zastosowaniem HPLC/FLD w następujących warunkach oznaczania chromatograficznego: kolumna Ultra C18 w temperaturze 40 °C, faza ruchoma (metanol: kwas octowy, roztwór 0,1%) w stosunku objętościowym 90: 10 (v/v), natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min, dozowanie próbki 10 µl, ustalone długości fali analitycznej detektora FLD to: $\lambda_{ex} = 288$ nm, $\lambda_{em} = 389$ nm. W tych warunkach benzydynam można oznaczać w obecności większości substancji, które nie wykazują zjawiska fluorescencji, a także w obecności: bifenylo-4-aminy, 1-naftyloaminy i 2-naftyloaminy (rys. 1.).

Establishing chromatographic determination conditions

The preliminary studies showed that benzidine would be determined using HPLC/FLD under the following chromatographic conditions: Ultra C18 column at 40 °C, mobile phase (methanol: acetic acid, solution 0.1%), in volumetric ratio of 90:10 (v/v), mobile phase volumetric flow rate 0.6 ml/min, sample dose of 10 µl, determined wavelengths of the FLD's analytical wave are: $\lambda_{ex} = 288$ nm, $\lambda_{em} = 389$ nm. Under these conditions, benzidine may be determined in the presence of most substances which do not show the phenomenon of fluorescence, as well as in the presence of: biphenyl-4-amine, 1-naphthylamine and 2-naphthylamine (Fig. 1).



Rys. 1. Chromatogram roztworu wzorcowego benzydyny w metanolu w obecności 2-naftyloaminy, 1-naftyloaminy i bifenylo-4-aminy. HPLC-FLD ($\lambda_{ex/em} = 288/389$ nm). Kolumna Ultra C18 (250 mm), temperatura kolumny 40 °C, faza ruchoma: metanol i kwas octowy, roztwór 0,1% (90: 10, v/v), natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej przez kolumnę 0,6 ml/min.

Legenda: benzydyna ($t_r = 4,058$ min), 2-naftyloamina ($t_r = 5,062$ min), bifenilo-4-amina ($t_r = 5,467$ min). 1-Naftyloamina nie daje sygnału w tych warunkach

Fig. 1. Chromatogram of the standard solution of benzidine in methanol in the presence of 2-naphthylamine, 1-naphthylamine and biphenyl-4-amine. HPLC-FLD ($\lambda_{ex/em} = 288/389$ nm). Ultra C18 column (250 mm), column temperature 40 °C, mobile phase: methanol and acetic acid, solution 0.1% (90:10, v/v), mobile phase volumetric flow through the column 0.6 ml/min.

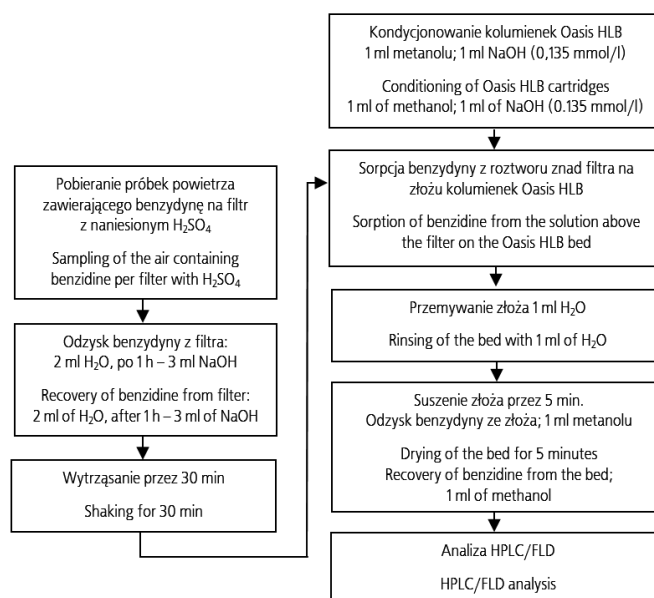
Key: Benzidine ($t_r = 4.058$ min), 2-naphthylamine ($t_r = 5.062$ min), biphenyl-4-amine ($t_r = 5.467$ min). 1-Naftyloamina does not present a signal under these conditions

Ustalenie warunków pobierania próbek powietrza

Do pobierania próbek powietrza zawierającego benzydynę zastosowano filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm z naniesionym kwasem siarkowym(VI), jak w metodzie OSHA 65. Na filtry naniesiono 50 μ l roztworu benzydyny w metanolu o stężeniu 24 μ g/ml, co odpowiada 1,2 μ g benzydyny (10 μ g/m³), a po tym, jak wyschły, umieszczono je szeregowo w oprawkach: I filtr z naniesioną substancją i II filtr bez naniesionej benzydyny. Następnie złożono układ składający się z połączonych szeregowo filtrów i pompy ssącej o regulowanym i kontrolowanym rotametrem strumieniu objętości powietrza. Przez ten układ przepuszczono 120 l powietrza ze stałym strumieniem objętości: 120; 60 i 20 l/h. Takie same badania przeprowadzono, gdy na filtry z włókna szklanego pokryte kwasem siarkowym(VI) naniesiono 25 μ l roztworu benzydyny w metanolu o stężeniu 24 μ g/ml, co odpowiada 0,6 μ g benzydyny (5 μ g/m³). Po pobraniu próbki powietrza każdy filtr przeniesiono do oddzielnej kolby, dodano po 2 ml wody i pozostawiono na 1 h. Po tym czasie dodano 3 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,135 mol/l i całość wytrząsano przez 30 min. Następnie próbki poddano ekstrakcji do fazy stałej na kolumnkach Oasis HLB w celu wzbogacenia analitu i wymiany rozpuszczalnika na metanol. Roztwory benzydyny w metanolu oznaczano chromatograficznie. Sposób przygotowania próbki do analizy przedstawiono schematycznie na rysunku 2.

Determination of air sampling conditions

For sampling of air containing benzidine, glass fibre filters with a diameter of 37 mm, coated with sulphuric acid were used, as in the OSHA 65 method. Then, 50 μ l of the benzidine solution in methanol with a concentration of 24 μ g/ml was applied to the filters, which corresponds to 1.2 μ g of benzidine (10 μ g/m³), and after drying, they were placed in series in the holders: The 1st filter coated with the substance and the 2nd filter without any benzidine applied. A system consisting of serially connected filters and a suction pump with an adjustable and rotameter-controlled air volumetric flow was then assembled. Then, 120 l of air was passed through this system with a constant volumetric flow of: 120; 60 and 20 l/h. The same tests were carried out when 25 μ l of the benzidine solution in methanol with a concentration of 24 μ g/ml was applied to the glass fibre filters coated with sulphuric acid, corresponding to 0.6 μ g of benzidine (5 μ g/m³). After collection of the air sample, each filter was moved to a separate flask, 2 ml of water was added and was left for 1 h. After this time, 3 ml of sodium hydroxide solution with a concentration of 0.135 mol/l was added and the whole mixture was shaken for 30 minutes. The samples were then extracted to the solid phase on Oasis HLB cartridges to enrich the analyte and to replace the solvent with methanol. Solutions of benzidine in methanol were determined chromatographically. The method of preparing the sample for analysis is presented schematically in Fig. 2.



Rys. 2. Schemat przygotowania próbki do analizy
Fig. 2. Diagram of sample preparation for analysis

Wyniki badań adsorpcji benzydiny na filtrach z naniesionym kwasem siarkowym(VI) przedstawiono w tabeli 2.

The results of the benzidine adsorption tests on filters coated with sulphuric acid are presented in Table 2.

Tabela 2. Badania adsorpcji benzydiny na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), połączone szeregowo. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

Table 2. Tests of benzidine adsorption onto glass fibre filters with sulphuric acid, connected in series. Ultra C18 column, column temperature 40 °C, FLD detector

Numer próbki Sample No.	Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h Flow rate of absorbed air, l/h	Czas pochłaniania, h Absorption time, h	Przybliżone stężenie substancji w powietrzu, µg/m ³ Approximate concentration of the substance in the air, µg/m ³	Powierzchnia pików substancji w roztworach po odzysku Area of the substance's peaks in solutions after recovery	
				I filtr 1st filter	II filtr 2nd filter
1				4040,8	-
2	120	1	10	4307,4	-
1				3413,3	-
2	60	2	10	3095,6	-
1				2850,1	-
2	20	6	10	2767,6	-
1				1976,4	-
2	120	1	5	1927,2	-
1				1659,5	-
2	60	2	5	1351,0	-
1				1230,7	-
2	20	6	5	1456,8	-

Uzyskane wyniki wskazują na całkowite zatrzymanie się benzydiny na pierwszym filtrze. Na tej podstawie ustalono, że jeden filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI) zapewni ilościowe wyodrębnienie benzydiny z powietrza.

Badanie stopnia odzysku/desorpcji

W celu określenia stopnia odzysku/desorpcji benzydiny z filtrów dla trzech stężeń zakresu pomiarowego przeprowadzono następujące badania. Na sześć filtrów naniesiono po: 10; 100 i 200 μl roztworu benzydiny w metanolu o stężeniu 1,2 $\mu\text{g/ml}$. Złożono zestaw składający się z filtrów z naniesionym analitem umieszczonych w oprawkach. Przez filtry te przepuszczano 120 l czystego powietrza ze strumieniem objętości 20 l/h. Po pobraniu próbki powietrza każdy filtr przeniesiono do kolby i dalej postępowano wg schematu przedstawionego na rysunku 2. Roztwory uzyskane po wzbogacaniu analitu oznaczano chromatograficznie.

Po odczytaniu powierzchni pików z chromatogramów badanych roztworów obliczono współczynniki odzysku/desorpcji. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 3.

The results obtained indicate that benzidine is completely retained on the first filter. On this basis, it was established that one glass fibre filter coated with sulphuric acid ensures the quantitative extraction of benzidine from the air.

Recovery/desorption rate test

The following tests were carried out to determine the degree of benzidine recovery/desorption from the filters for three concentrations of the measuring range. Six filters were coated with: 10; 100 and 200 μl of a methanol solution of 1.2 $\mu\text{g/ml}$. A set consisting of filters coated with the analyte placed in holders was assembled. These filters were blown with 120 litres of clean air at the volumetric flow rate of 20 l/h. After collection of the air sample, each filter was moved to the flask and the test was continued in accordance with the diagram presented in Fig. 2. The solutions obtained after enrichment were determined chromatographically.

Recovery/desorption rates were calculated after reading the peak area from the chromatograms of the tested solutions. The results are presented in Table 3.

Tabela 3. Badania stopnia odzysku/desorpcji benzydiny z filtra. HPLC-FLD, kolumna Ultra C18

Table 3. Testing the degree of recovery/desorption of benzidine from the filter. HPLC-FLD, Ultra C18 column

Masa benzydiny naniesiona na filtr, ng Benzidine mass applied to a filter, ng	Średnia powierzchnia pików z roztworów po odzysku/desorpcji Average area of peaks from recovery/desorption	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych Average area of peaks from comparative solutions	Średni współczynnik odzysku/desorpcji Average recovery/desorption rate
12	25,8	32,95	0,78
120	268,9	324,39	0,83
240	543,0	698,0	0,78

Średni współczynnik odzysku/desorpcji wynosi 0,80.

Kalibracja i precyzja

Oznaczanie kalibracyjne wykonywano dla roztworów benzydiny w metanolu. Zakres stężeń roztworów wzorcowych wynosi 12 ÷ 240 ng/ml. Do oznaczeń kalibracyjnych przygotowano po trzy serie roztworów, które poddano analizie chromatograficznej w warunkach opisanych wyżej. Wykresy za-

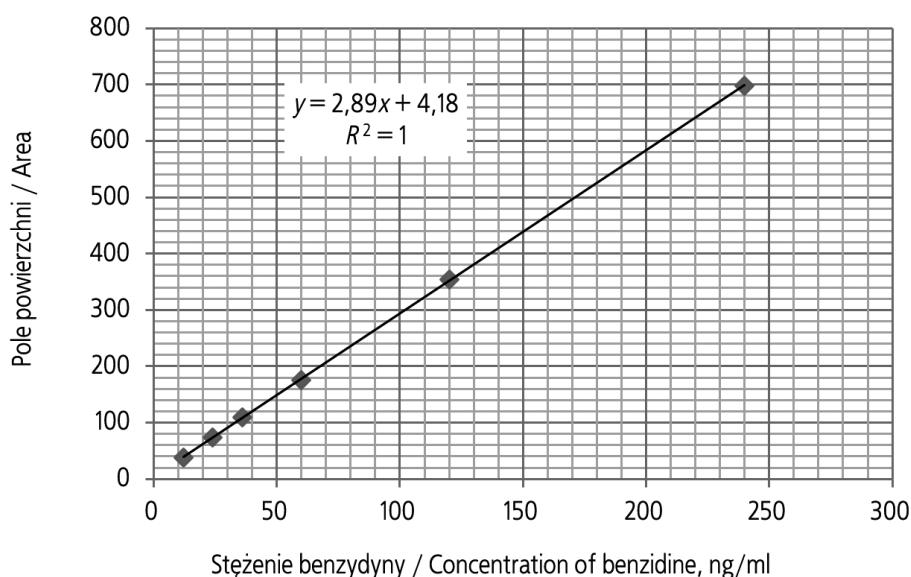
The average recovery/desorption rate is 0.80.

Calibration and precision

Calibration determination was performed for solutions of benzidine in methanol. The range of concentrations of standard solutions was 12 ÷ 240 ng/ml. Three series of solutions were prepared for the calibration determinations, which were subjected to chromatographic analysis

leżności powierzchni pików benzydyny od jej stężeń w roztworach wzorcowych przedstawiono na rysunku 3. Współczynnik nachylenia b krzywej kalibracji (rys. 3.) o równaniu $y = bx + a$, charakteryzujący czułość metody, wynosi 2,89. Liniowość krzywej wzorcowej charakteryzowana jest wartością współczynnika korelacji. Współczynnik korelacji r wynosi 1.

under the conditions described above. Diagrams of dependency of the benzidine peak areas on its concentrations in the standard solutions are shown in Fig. 3. The slope factor b of the calibration curve (Fig. 3.) with the equation $y = bx + a$, characterising the sensitivity of the method, is 2.89. The linearity of the calibration curve is characterised by the value of the correlation coefficient. The correlation factor r is 1.



Rys. 3. Wykres zależności powierzchni pików od stężenia benzydyny w roztworach wzorcowych. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

Fig. 3. Diagram of the relationship between the peak area and the concentration of benzidine in the standard solutions. Ultra C18 column, column temperature 40 °C, FLD detector

W celu oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych przygotowano trzy serie po osiem roztworów roboczych benzydyny w metanolu o stężeniach: 12; 120 i 240 ng/ml. Dla każdego roztworu wykonano po dwa pomiary chromatograficzne w warunkach identycznych z tymi przy wykonaniu oznaczeń kalibracyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Wartości charakteryzujące precyzję oznaczeń kalibracyjnych zestawiono w tabeli 4. Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężenia wynoszą odpowiednio: 2,85; 1,65 i 0,53%.

Badanie trwałości próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza badano po 1 dniu oraz po: 3, 5, 7 i 10 dniach przechowywania w eksykatorze po zabezpieczeniu filtrów przed działaniem promieni słonecznych. Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

To assess the precision of the calibration determinations, three series of eight working solutions of benzidine in methanol were prepared in the following concentrations: 12; 120 and 240 ng/ml. For each solution, two chromatographic measurements were performed under conditions identical to those of the calibration determinations. On the basis of the results obtained, the standard deviation and the coefficient of variation were calculated. The values characterising the precision of the calibration determinations are listed in Table 4. The coefficients of variation for successive concentration levels are: 2.85; 1.65 and 0.53%, respectively.

Durability testing of samples

The durability of the air samples collected was tested after 1 day and after: 3, 5, 7 and 10 days of storage in the desiccator after protecting the filters against the effects of sunlight. The results are presented in Table 5.

Tabela 4. Precyzja oznaczeń kalibracyjnych benzydyny. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD**Table 4.** Precision of the calibration determinations of benzidine. Ultra C18 column, column temperature 40 °C, FLD detector

Badany parametr / Tested parameter	Seria pomiarów / Measurement series ($n = 8$)		
	I	II	III
Stężenie roztworu / Solution concentration, ng/ml	12	120	240
Średnia powierzchnia pików / Average area of peak	32,95	324,39	647,05
Odchylenie standardowe / Standard deviation	0,94	5,35	3,44
Współczynnik zmienności / Coefficient of variation, %	2,85	1,65	0,53
Średnia precyzja – średni współczynnik zmienności dla zakresu pomiarowego / Average precision – mean coefficient of variation for the measurement range, %	1,93		

Tabela 5. Trwałość próbek przechowywanych w ekwyatorze. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD**Table 5.** Durability of samples stored in the desiccator. Ultra C18 column, column temperature 40 °C, FLD detector

Numer filtra Filter number	Czas przechowywania, liczba dni Storage time, number of days	Średnie pola powierzchni pików Average area of peaks	Średnia Average	Odchylenie standardowe Standard deviation
1	1	255,00	252,15	4,0
2		249,30		
1	3	228,50	239,80	16,0
2		251,10		
1	5	235,90	245,78	14,0
2		255,65		
1	7	278,05	241,23	52,1
2		204,40		
1	10	258,05	275,68	24,9
2		293,30		

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że próbki przechowywane w temperaturze pokojowej (20 ± 2 °C) zachowują trwałość co najmniej 7 dni.

On the basis of the results obtained, it was found that samples stored at room temperature (20 ± 2 °C) remain stable for at least 7 days.

Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności oraz granice oznaczalności wyznaczono na podstawie wyników analizy trzech ślepych prób. Granice wykrywalności obliczono na podstawie wartości odchylenia standardowego S_0 zbioru sygnałów dla ślepej próby i kąta nachylenia krzywej kalibracji – współczynnika kierunkowego b krzywej kalibracji (rys. 3.) o równaniu $y = bx + a$. Do obliczenia wartości granicy wykrywalności wykorzystano zależność:

Determination of the limit of detection and quantification

The limit of detection and the limit of quantification were determined on the basis of the results of the analysis of three blank tests. The limit of detection was calculated from the standard deviation values S_0 of a set of signals for the blank test and the angle of inclination of the calibration curve – directional factor b of the calibration curve (Fig. 3.) with the equation $y = bx + a$. To calculate the limit of detection, the following equation was used:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_0}{b}$$

W celu obliczenia odchylenia standardowego wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych przeprowadzono dziesięć niezależnych pomiarów powierzchni piku o czasie retencji benzydiny dla trzech niezależnie przygotowanych ślepych prób (próbka przygotowana identycznie jak próbka rzeczywista, bez benzydiny).

Granica oznaczalności (LOQ) jest wielokrotnością wyznaczonej wartości granicy wykrywalności (LOD) i obliczono ją ze wzoru:

$$LOQ = 3 \cdot LOD.$$

Wyniki przedstawiono w tabeli 6.

In order to calculate the standard deviation of the results obtained for a series of blank samples, ten independent measurements of the peak area with a benzidine retention time were carried out for three independently prepared blank samples (sample prepared identical to the actual sample, without benzidine).

The limit of quantification (LOQ) is a multiple of the determined limit of detection (LOD) and is calculated by the formula:

The results are presented in Table 6.

Tabela 6. Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności benzydiny dla wartości parametrów regresyjnych krzywej wzorcowej sporządzonej z roztworów wzorcowych w metanolu. HPLC-FLD, kolumna Ultra C18

Table 6. Determination of the limit of detection and determination of benzidine for the regression parameter values of the calibration curve made from standard solutions in methanol. HPLC-FLD, Ultra C18 column

Badany parametr / Tested parameter	Ślepe próby / Blank tests		
	1	2	3
Powierzchnia piku chromatograficznego o czasie retencji benzydiny Chromatographic peak area with benzidine retention time	0,12	0,047	0,0088
	0,12	0,049	0,0084
	0,11	0,049	0,0086
	0,12	0,042	0,0043
	0,11	0,055	0,0047
	0,11	0,060	0,0051
	0,11	0,044	0,0034
	0,12	0,044	0,0037
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0 Standard deviation of the results obtained for a series of blank samples, S_0	0,13	0,054	0,0080
	0,13	0,043	0,0087
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0 Standard deviation of the results obtained for a series of blank samples, S_0	0,008	0,006	0,002
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0 Standard deviation of the results obtained for a series of blank samples, S_0	0,0054		
Równanie krzywej kalibracji / Calibration curve equation: $y = bx + a$	$y = 2,89 x + 4,18$		
Współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji / Directional coefficient of the calibration curve, b	2,89		
Granica wykrywalności / Limit of detection, LOD, pg/ml	6,2		
Granica oznaczalności / Limit of quantification, LOQ, pg/ml	18,5		

Kalibracja z filtrów po ekstrakcji do fazy stałej (SPE)

Ze względu na wieloetapowy sposób przygotowania próbki do analizy przyjęto, że krzywa kalibracyjna będzie przygotowywana poprzez nanoszenie na filtry roztworów wzorcowych

Calibration from filters after solid phase extraction (SPE)

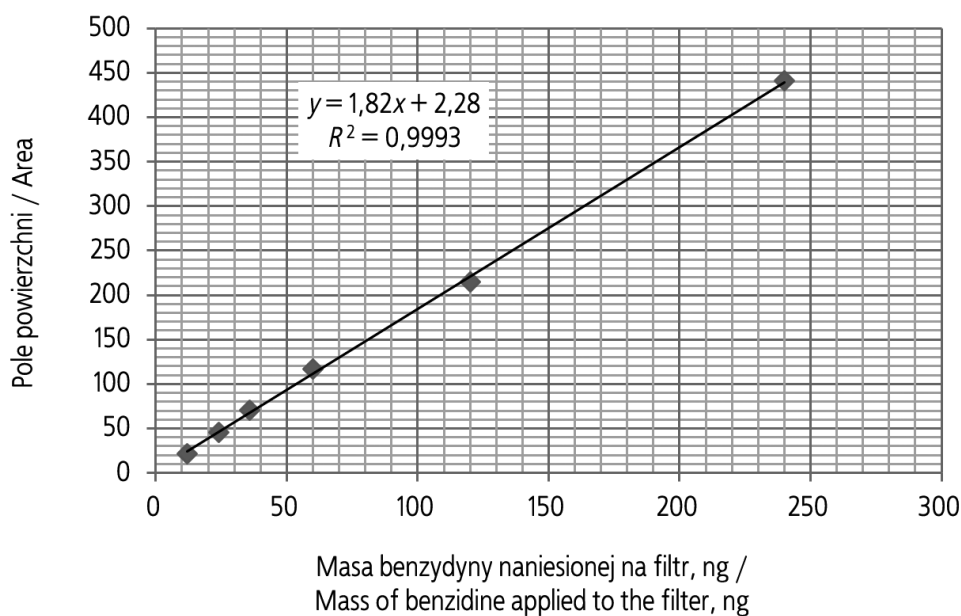
Due to the multistage method of preparing the sample for analysis, it was assumed that the calibration curve would be prepared by applying standard solutions with increasing concentrations

o wzrastających stężeniach. Przy takim sposobie sporządzania krzywej kalibracji nie ma konieczności wyznaczania współczynnika odzysku, ponieważ filtry z benzydyną pobieraną na stanowiskach pracy będą poddawane takiej samej procedurze przygotowania do analizy, jak filtry z substancją naniesioną w laboratorium do sporządzenia krzywej kalibracyjnej. Ewentualne straty substancji wynikające ze sposobu przygotowania próbki do analizy będą identyczne w obu przypadkach.

Oznaczanie kalibracyjne wykonywano dla osiemnastu filtrów z naniesionym kwasem siarkowym(VI). Na każde trzy filtry naniesiono kolejno: 10; 20; 30; 50; 100 i 200 µl (trzy serie kalibracyjne) roztworu wzorcowego benzydyny w metanolu o stężeniu 1,2 µg/ml i pozostawiono do następnego dnia. Następnie próbki przygotowano do analizy według procedury przedstawionej na rysunku 2. Uzyskane w ten sposób roztwory kalibracyjne poddano analizie chromatograficznej i sporządzono wykres zależności powierzchni pików benzydyny od masy substancji naniesionej na filtr (rys. 4.).

on the filters. With this method of creating the calibration curve, it is not necessary to determine the recovery factor, since the filters with benzidine collected at workplaces will be subjected to the same procedure of preparation for analysis as the filters coated with the substance in the laboratory for the preparation of the calibration curve. Possible losses of the substance resulting from the method of sample preparation for analysis would be identical in both cases.

Calibration determination was performed for eighteen filters coated with sulphuric acid. The following was applied successively on each three filters: 10; 20; 30; 50; 100 and 200 µl (three calibration series) of the standard solution of benzidine in methanol at 1.2 µg/ml and was left until the next day. Then the samples were prepared for analysis in accordance with the procedure presented in Fig. 2. The calibration solutions obtained were subjected to chromatographic analysis and a diagram was drawn up showing the relation between the surface of benzidine peaks and the weight of the substance applied to the filter (Fig. 4.).



Rys. 4. Wykres zależności powierzchni pików od masy benzydyny naniesionej na filtr. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

Fig. 4. Diagram of the relationship between the peak area and the weight of benzidine applied to the filter. Ultra C18 column, column temperature 40 °C, FLD detector

Współczynnik nachylenia b krzywej kalibracji (rys. 4.) o równaniu $y = bx + a$, charakteryzujący czułość metody, wynosi 1,82. Współczynnik korelacji r charakteryzujący liniowość krzywej wzorcowej wynosi 0,9997. Przy takim sposobie przeprowadzania kalibracji wydajność odzysku jest uwzględniona w krzywej wzorcowej.

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono według wytycznych zawartych w normie PN-EN 482. Granicę wykrywalności i granicę oznaczalności wyznaczono na podstawie wyników analiz trzech niezależnie przygotowanych ślepych prób w taki sam sposób, jak przedstawiono wyżej. Wyniki wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności benzydyny dla wartości parametrów regresyjnych krzywej wzorcowej sporządzonej z filtrów z uwzględnieniem odzysku/desorpcji przedstawiono w tabeli 7.

Dane walidacyjne uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 8.

The slope factor b of the calibration curve (Fig. 4.) with the equation $y = bx + a$, characterising the sensitivity of the method, is 1.82. The correlation factor r , characterising the linearity of the standard curve, is 0.9997. With this method of calibration, the recovery efficiency is taken into account in the calibration curve.

Method validation

The method was validated according to the guidelines included in Standard No. PN-EN 482. The limit of detection and the limit of quantification were determined on the basis of the results of the analyses of three independently prepared blank samples in the same way as shown above. The results of the determination of the limit of detection and quantification of benzidine for the regression values of the standard curve made from filters taking into account recovery/desorption are shown in Table 7.

The validation data obtained on the basis of the tests performed are presented in Table 8.

Tabela 7. Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności benzydyny dla wartości parametrów regresyjnych krzywej wzorcowej sporządzonej z uwzględnieniem odzysku (roztwory z filtrów). HPLC-FLD, kolumna Ultra C18

Table 7. Determination of the limit of detection and quantification of benzidine for the regression parameter values of the calibration curve prepared taking into account recovery (solutions from filters). HPLC-FLD, Ultra C18 column

Parametr / Parameter	Wartość / Value
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0 Standard deviation of the results obtained for a series of blank samples, S_0	0,0054
Równanie krzywej kalibracji / Calibration curve equation: $y = bx + a$	$y = 1,82x + 2,28$
Współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji / Directional coefficient of the calibration curve, b	1,82
Granica wykrywalności / Limit of detection, pg/ml	9,8
Granica oznaczalności / Limit of quantification, pg/ml	29,4

Tabela 8. Parametry walidacyjne metody oznaczania benzydyny

Table 8. Validation parameters of the method for determining benzidine

Parametr / Parameter	Wartość / Value
Zakres pomiarowy / Measurement range	0,1 ÷ 2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Ilość pobranego powietrza / Amount of air collected	120 l
Zakres krzywej wzorcowej / Calibration curve range	12 ÷ 240 ng/ml
Granica wykrywalności / Limit of detection	9,8 pg/ml (0,082 ng/ m^3)
Granica oznaczalności / Limit of quantification	29,4 pg/ml (0,25 ng/ m^3)
Całkowita precyzja badania / Total precision of the test	5,36%
Względna niepewność całkowita / Total relative uncertainty	12%
Niepewność rozszerzona / Expanded uncertainty	23%

PODSUMOWANIE / CONCLUSION

W wyniku badań opracowano metodę oznaczania benzydiny w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym. Metoda polega na przepuszczeniu badanego powietrza zawierającego benzydinę przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI). Po odzysku wodą i roztworem wodorotlenku sodu, a następnie ekstrakcji do ciała stałego na kolumnkach Oasis HLB roztwór benzydiny w metanolu jest analizowany z zastosowaniem kolumny Ultra C18 (250 × 4,5 mm, 5 µm). Krzywą kalibracji sporządzano poprzez naniesienie benzydiny na filtry. Przy takim sposobie wyznaczania krzywej kalibracji nie jest wymagane wyznaczanie współczynnika odzysku/desorpcji. To z kolei powoduje zmniejszenie ilości wykonywanych czynności, a w rezultacie skrócenie czasu analizy i zmniejszenie zużycia odczynników.

Opracowana metoda umożliwia oznaczenie benzydiny w zakresie stężeń 0,1 ÷ 2 µg/m³. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją oraz dokładnością i może być wykorzystywana do oznaczania benzydiny w powietrzu na stanowiskach pracy w celu oceny narażenia pracowników na tę substancję.

As a result of the research, a method for the determination of benzidine in the air at workplaces was developed using a high-performance liquid chromatograph with a fluorescence detector. The method consists of passing the tested air containing benzidine through a glass fibre filter coated with sulphuric acid. After recovery with water and sodium hydroxide solution, and then extraction to a solid on Oasis HLB cartridges, the solution of benzidine in methanol is analysed using the Ultra C18 column (250 × 4.5 mm, 5 µm). The calibration curve was prepared by applying benzidine to the filters. With this method of determination of the calibration curve, no recovery/desorption rate determination is required. This in turn reduces the number of operations performed and consequently reduces the time of the analysis and reagent consumption.

The prepared method allows for the determination of benzidine within the range of concentrations of 0.1÷2 µg/m³. The method is characterised by optimum precision and accuracy and may be used for the determination of benzidine in workplace air in order to assess the exposure of workers to the substance.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

Case R.A.M., Hosker M.E., McDonald D.B., Pearson J.T. (1954). Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, α-naphthylamine and β-naphthylamine. *Br. J. Ind. Med.* 11(2), 75–104.

CHEMINFO (2007). Chemical profiles created by Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CCOHS). Benzidine. Record number 240 [<http://www.intox.org/databank/documents/chemical/benzidine/cie240.htm>, dostęp: 23.03.2020].

ChemPył (2020). Baza wiedzy o zagrożeniach chemicznych i pyłowych [Knowledge base on chemical and dust hazards]. Warszawa, CIOP-PIB.

Elskamp C.J. (1989). Benzidine, 3,3'-Dichlorobenzidine, 2,4-Toluenediamine, 2,6-Toluenediamine. Organic Methods Evaluation Branch, Occupational Safety and Health Administration (OSHA) Method no: 65, Salt Lake City, Utah, USA.

GESTIS (2011). Benzidine. GESTIS Substance database. Germany, Sankt Augustin, BG Institute for Occupational Safety and Health.

IARC (1972). Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds and natural products. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals in Humans 1, 80–86.

IARC (1982). Some industrial chemicals and dyestuffs. IARC Monog. Eval. Carc. 29, 149–184.

IARC (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. IARC Monog. Eval. Carc., Suppl 7, 123–125.

IARC (2010). Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. IARC Monog. Eval. Carc. 99, 141–246.

IARC (2012). Chemical agents and related occupations. IARC Monog. Eval. Carc. 100F, 53–61.

- Jeżewska A., Buszewski B. (2010). Bifenylo-4-amina – metoda oznaczania [4-Aminobiphenyl – determination method]. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 1(63), 101–106.
- Jeżewska A., Buszewski B. (2011). Isolation and determination of 4-biphenylamine for air sample by SPE-HPLC coupling. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 34(6), 397–407.
- Morales R., Rappaport S.M., Hermes R.E. (1979). Air sampling and analytical procedures for benzidine, 3,3'-dichlorobenzidine and their salts. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 40(11), 970–978.
- Obwieszczenie Ministra Przedsiębiorczości i Technologii z dnia 14 czerwca 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Gospodarki w sprawie ograniczeń produkcji, obrotu lub stosowania substancji i mieszanin niebezpiecznych lub stwarzających zagrożenie oraz wprowadzania do obrotu lub stosowania wyrobów zawierających takie substancje lub mieszaniny. Dz.U. 2019 poz. 1226 [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-04145-02:1985 Ochrona czystości powietrza – Badania zawartości benzydyny – Oznaczanie zawartości benzydyny na stanowiskach pracy metodą kolorymetryczną [Polish standard].
- PN-Z-04145-03:1985 Ochrona czystości powietrza – Badania zawartości benzydyny – Oznaczanie zawartości benzydyny na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [Polish standard].
- PubChem (2011). National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzidine, CID=7111 [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7111, data dostępu: 19.06.2020].
- Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/669 z dnia 16 kwietnia 2018 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu naukowo-technicznego, rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin. Dz. Urz. UE z dnia 4.05.2018 r. (L 115/1) [Commission Regulation (EU) 2018/669 of 16 April 2018 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures].
- Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12 czerwca 2018 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. Dz.U. 2018 poz. 1286 ze zm. [Polish legal act].
- Schwenecke H., Mayer D. (2005). Benzidine and benzidine derivatives. [W:] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th ed., New York, John Wiley & Sons, 18.
- Scott T.S. (1952). The incidence of bladder tumours in a dyestuffs factory. *Brit. J. Ind. Med.* 9(2), 127–132.
- Seymour M.J. (1994). Benzidine and 3,3'-dichlorobenzidine. National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) Method no: 5509. *NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM)*, 4th ed.

**PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA BENZYDINY
W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY**
**ANALYTICAL PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF BENZIDINE
IN WORKPLACE AIR**

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania benzydiny w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarno-higienicznych.

Najmniejsze stężenie benzydiny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (dla próbki powietrza o objętości 120 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 przepuszczeniu badanego powietrza zawierającego benzydynę przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym(VI), wymyciu osadzonej na filtrze benzydiny wodą i roztworem wodorotlenku sodu, ekstrakcji do fazy stałej w celu wzbogacenia analitu oraz wymiany rozpuszczalnika na metanol i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Dokładność ważenia

O ile nie zaznaczono inaczej, substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do $0,0002 \text{ g}$.

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

1. Scope of the procedure

This procedure describes the method for determining benzidine in workplace air using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. The method is used during the inspection of sanitary and hygiene conditions.

The smallest concentration of benzidine that can be determined under the air sampling and marking conditions described in the procedure is $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (for a 120-litre air sample).

2. Normative references

Standard No. PN-Z-04008-7 Air purity protection – Sampling – Rules for sampling air in the working environment and interpretation of the results.

3. Method principle

The method consists of passing the tested air containing benzidine through a glass fibre filter coated with sulphuric acid, washing off the benzidine deposited on the filter with water and sodium hydroxide solution, extraction to solid phase to enrich the analyte and the replacement of the solvent with methanol and chromatographic analysis of the solution obtained.

4. General guidelines

4.1. Weighing accuracy

Unless otherwise indicated, the substances used in the analysis should be weighed to the accuracy of 0.0002 g .

4.2. Handling of dangerous substances

Operations involving the use of organic solvents should be carried out with personal protective equipment under a well-functioning laboratory fume hood. After analysis, solutions of reagents and standards should be collected in specially designated containers and transferred for disposal to authorised institutions.

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

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

5.1. Benzydyna

5.2. Metanol

Stosować metanol o czystości do HPLC.

5.3. Kwas octowy

Stosować roztwór w wodzie o ułamku objętościowym 0,1%.

5.4. Kwas siarkowy(VI)

Stosować roztwór o stężeniu $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,26 \text{ mol/l}$.

5.5. Wodorotlenek sodu

Stosować roztwór o stężeniu $c(\text{NaOH}) = 0,135 \text{ mmol/l}$.

5.6. Wodorotlenek sodu

Stosować roztwór o stężeniu $c(\text{NaOH}) = 0,135 \text{ mol/l}$.

5.7. Woda

Stosować wodę destylowaną o czystości do HPLC zwaną w dalszej części procedury wodą.

5.8. Roztwór wzorcowy podstawowy benzydyny
Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 100 ml odważyć około 24 mg benzydyny wg punktu 5.1., uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.2. i dokładnie wymieszać. Stężenie benzydyny w tak przygotowanym roztworze wynosi około 0,24 mg/ml.

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość co najmniej 7 dni.

5.9. Roztwór wzorcowy pośredni benzydyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml przemieścić 50 μl roztworu wzorcowego podstawowego benzydyny wg punktu 5.8., uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.2. i zawartość dokładnie wymieszać. Zawartość benzydyny w 1 ml tak przygotowanego roztworu wynosi 1,2 μg .

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość co najmniej 7 dni.

5.10. Filtry

Filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm. Na filtry nanosić po 0,5 ml kwasu siarkowego(VI) wg punktu 5.4. i pozostawić do wyschnięcia. Suche filtry przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.

5.11. Kolumnienki do ekstrakcji

Stosować dostępne w handlu kolumnienki do ekstrakcji do fazy stałej o pojemności 1 ml, wypełnione

5. Reagents, solutions and materials

Unless otherwise specified, substances with at least analytical purity grade.

5.1. Benzidine

5.2. Methanol

For HPLC, use high-purity grade methanol.

5.3. Acetic acid

Use a solution in water with a 0.1% volumetric fraction.

5.4. Sulphuric acid

Use a solution with a concentration of $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.26 \text{ mol/l}$.

5.5. Sodium hydroxide

Use a solution with a concentration of $c(\text{NaOH}) = 0.135 \text{ mmol/l}$.

5.6. Sodium hydroxide

Use a solution with a concentration of $c(\text{NaOH}) = 0.135 \text{ mol/l}$.

5.7. Water

For HPLC, use distilled water of high purity, hereinafter called water.

5.8. Standard primary benzidine solution

Place approximately 24 mg of benzidine in a weighed measuring flask of 100 ml as per section 5.1., fill up with methanol up to the marked level as per section 5.2. and mix thoroughly. The concentration of benzidine in a solution prepared in this way is about 0.24 mg/ml.

If stored in a refrigerator, the solution should remain stable for at least 7 days.

5.9. Standard intermediate benzidine solution

Transfer 50 μl of the standard primary benzidine solution to a 10 ml volumetric flask as per section 5.8., fill up to the marked level with methanol as per section 5.2. and mix the contents thoroughly. The content of benzidine in 1 ml of a solution prepared in this way is 1.2 μg .

If stored in a refrigerator, the solution should remain stable for at least 7 days.

5.10. Filters

Glass fibre filters with a diameter of 37 mm. Apply 0.5 ml of sulphuric acid to the filters as per section 5.4. and leave to dry. Store the dry filters in a sealed vessel.

5.11. Extraction cartridges

It is necessary to use commercially available solid-phase extraction cartridges with a capacity of 1 ml, filled with 30 milligrams of sorbent (*N*-vinylpyrrolidone and divinylbenzene copolymer).

30-miligramową warstwą sorbentu (kopolimer *N*-winylopirolidonu i diwinylobenzenu).

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

6.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem fluorescencyjnym.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie benzydyny w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową o uziarnieniu 5 µm, o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm.

6.3. Pompa ssąca

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

6.4. Kolby stożkowe

Kolby stożkowe o pojemności 25 ml wyposażone w korki.

6.5. Strzykawki do cieczy

Strzykawki do cieczy o pojemności 10 ÷ 2 500 µl.

6.6. Zestaw próżniowy do ekstrakcji do fazy stałej.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 5.10. przepuścić 120 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 120 l/h.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej 7 dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać rozdzielenie benzydyny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.2. przykładowe warunki oznaczania są następujące:

- faza ruchoma: metanol:
kwas octowy wg punktu 5.3. 90: 10
- temperatura kolumny 40 °C
- natężenie przepływu
strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min

6. Measuring instruments and auxiliary equipment

Use typical laboratory equipment and the following:

6.1. Liquid chromatograph

Liquid chromatograph with fluorescence detector.

6.2. Chromatographic column

Chromatographic column allowing for determination of benzidine in the presence of other substances simultaneously occurring in the tested air, e.g. a column filled with silica gel modified with an octadecyl group with a grain size of 5 µm, length of 250 mm and internal diameter of 4.6 mm.

6.3. Suction pump

Suction pump for air intake with constant volumetric flow rate in accordance with section 7.

6.4. Conical flasks

25 ml conical flasks equipped with plugs.

6.5. Syringes for liquids

Syringes for liquids with a capacity of 10 ÷ 2,500 µl.

6.6. Vacuum set for extraction to solid phase.

7. Collection of air samples

Air samples should be taken in accordance with Standard No. PN-Z-04008-7. Pass 120 l of tested air at a constant volumetric flow rate of not more than 120 l/h through the filter as per Section 5.10.

If stored in a refrigerator, the samples collected should remain stable for at least 7 days.

8. Chromatograph operating conditions

The chromatograph operating conditions should be selected so as to obtain separation of benzidine from other substances present simultaneously in the air under test. If a column with the parameters specified in Section 6.2. is used, the examples of determination conditions are as follows:

- mobile phase: methanol:
acetic acid as per section 5.3. 90:10
- column temperature 40 °C
- mobile phase volumetric
flow rate 0.6 ml/min
- fluorescence detection
analytical wave length:
 - excitation 288 nm
 - emission 389 nm
 - sample dose 10 µl.

- długość fali analitycznej detektora fluorescencyjnego:
 - wzbudzenie 288 nm
 - emisja 389 nm
- dozowanie próbki 10 µl.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na sześć filtrów wg punktu 5.10. umieszczonych w kolbach stożkowych wg punktu 6.4. nanieść roztwór wzorcowy pośredni benzydyny wg punktu 5.9. w ilości: 10; 20; 30; 50; 100 i 200 µl. Filtry pozostawić do wyschnięcia. Następnie dodać po 2 ml wody, kolby zamknąć i pozostawić na około 1 h. Dodać 3 ml wodorotlenku sodu wg punktu 5.6. i pozostawić kolby na 30 min, wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Po tym czasie roztwory z nad filtrów przenieść na kolumnienki do ekstrakcji wg punktu 5.11. wcześniej kondycjonowane kolejno: 1 ml metanolu wg punktu 5.2. i 1 ml wodorotlenku sodu wg punktu 5.5. Po sorpcji analitu złożyć przemyć 1 ml wody i suszyć co najmniej 5 min pod próżnią wg punktu 6.6. Po tym czasie desorbować analit ze złoża 1 ml metanolu wg punktu 5.2. Zawartość benzydyny w 1 ml tak uzyskanych roztworów wynosi odpowiednio: 12; 24; 36; 60; 120 i 240 ng. Do chromatografu wprowadzić dwukrotnie po 10 µl tak uzyskanych roztworów. 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 zawartość benzydyny, w nanogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające średnie powierzchnie pików.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbki powietrza filtr przenieść do kolby stożkowej wg punktu 6.4., dodać 2 ml wody i dalej postępować tak jak przy sporządzaniu krzywej wzorcowej wg rozdziału 9. Do chromatografu wprowadzić dwukrotnie po 10 µl roztworów w metanolu. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików benzydyny wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Masę benzydyny odczytać z krzywej wzorcowej.

9. Drawing up a calibration curve

Apply the standard intermediate solution of benzidine as per Section 5.9 to six filters as per Section 5.10. placed in conical flasks as per Section 6.4. in the amount of: 10; 20; 30; 50; 100 and 200 µl. Leave the filters to dry. Then add 2 ml of water, close the flasks and leave them for about 1 h. Add 3 ml of sodium hydroxide as per section 5.6 and leave the flasks for 30 min, shaking them from time to time. After that time, the solutions from above the filters should be transferred to the extraction cartridges as per section 5.11., previously conditioned in succession: 1 ml of methanol as per section 5.2 and 1 ml of sodium hydroxide as per section 5.5. After the analyte is absorbed, wash the bed with 1 ml of water and dry for at least 5 minutes under vacuum as per section 6.6. After that time, desorb the analyte from the bed with 1 ml of methanol as per section 5.2. The content of benzidine in 1 ml of the solutions obtained in this way is respectively: 12; 24; 36; 60; 120 and 240 ng. Introduce 10 µl of these solutions twice to the chromatograph. Read the peak areas as indicated by the integrator and calculate the arithmetic mean. The difference between the results and the mean value should not be greater than 5% of the mean value. Then it is necessary to plot the calibration curve by plotting the content of benzidine on the x axis in nanograms and the corresponding average peak areas on the y axis.

10. Marking

After taking the air sample, the filter must be transferred to a conical flask as per section 6.4., then add 2 ml of water and proceed as in the preparation of the calibration curve as per section 9. Introduce 10 µl of the solutions in methanol twice to the chromatograph. Read from the obtained chromatograms the areas of the benzidine peaks as indicated by the integrator and calculate the arithmetic mean. The difference between the results and the mean value should not be greater than 5% of the mean value. Read the mass of benzidine from the calibration curve.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie benzydyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w mikrogramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{m}{V},$$

w którym:

m – masa benzydyny odczytana z krzywej wzorcowej, w nanogramach,

V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w litrach.

11. Calculation of the determination result

The concentration of benzidine (X) in the air under test should be calculated in micrograms per cubic metre from the formula:

where:

m – mass of benzidine, expressed from the calibration curve, in nanograms,

V – volume of air passed through the filter, in litres.

Adres do korespondencji/Contact details:

dr inż. ANNA JEŻEWSKA

e-mail: anjez@ciop.pl

Centralny Instytut Ochrony Pracy –

Państwowy Instytut Badawczy

00-701 Warszawa, ul. Czerniakowska 16

POLAND