

2-Metylo-4,6-dinitrofenol

Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy¹

2-Methyl-4,6-dinitrophenol Determination in workplace air

dr inż. ANNA JEŻEWSKA
e-mail: anjez@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS 534-52-1

Słowa kluczowe: 2-metylo-4,6-dinitrofenol, DNOC, metoda analityczna, HPLC-DAD, powietrze na stanowiskach pracy.

Keywords: 2-methyl-4,6-dinitrophenol, DNOC, determination method, HPLC-DAD, workplace air.

Streszczenie

2-Metylo-4,6-dinitrofenol (DNOC) jest żółtym ciałem stałym. Substancja ta działa: owadobójczo, grzybobójczo i chwastobójczo. Obecnie 2-metylo-4,6-dinitrofenol jest stosowany głównie jako inhibitor polimeryzacji oraz produkt pośredni w przemyśle chemicznym. Jest substancją bardzo toksyczną dla ludzi.

Celem pracy było opracowanie nowej metody oznaczania stężeń 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od 1/10 do 2 wartości NDS zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482.

Badania wykonano, stosując chromatograf cie-

zowy (HPLC) serii 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem diodowym (DAD). Oznaczenia prowadzono w układzie faz odwróconych (faza ruchoma: metanol: roztwór kwasu octowego) z zastosowaniem kolumny Ultra C18 (250 x 4,6 mm o $dp = 5 \mu\text{m}$).

Opracowana metoda oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu polega na przepuszczeniu badanego powietrza przez rurkę szklaną wypełnioną żelalem krzemionkowym. Próbkę desorbowano metanolem i poddano analizie chromatograficznej (HPLC-DAD). Na podstawie wyników badań ustalono warunki oznaczania 2-metylo-4,6-di-

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach III etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2014-2016 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej (Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej).

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

nitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie stężeń $0,005 \div 0,1 \text{ mg/m}^3$. Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy	$0,005 \div 0,1 \text{ mg/m}^3$
- granica wykrywalności, LOD	1,55 ng/ml
- granica oznaczalności, LOQ	4,66 ng/ml,
- całkowita precyzja badania	5,24 %,
- względna niepewność całkowita	11,5 %.

Opracowana metoda analityczna umożliwia selektywne oznaczanie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie stężeń od $0,005 \text{ mg/m}^3$ (1/10 wartości NDS) w obecności substancji współwystępujących – fenoli i krezoli. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych.

Opracowana metoda oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

Summary

2-Methyl-4,6-dinitrophenol (DNOC) is a yellow crystalline solid. It has insecticidal, fungicidal and herbicidal properties. Nowadays, DNOC is used as a polymerization inhibitor and as an intermediate in the chemical industry. It is extremely toxic to humans.

The aim of this study was to develop a new method for determining DNOC concentrations in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values in accordance with the requirements of Standard No. EN 482.

The study was performed using a liquid chromatograph (Agilent Technologies series 1200) with a diode array detector (DAD). The determination was performed in the reverse-phase system (mobile phase: methanol: solution of acetic acid) using an Ultra C18 column (250 × 4.6 mm with $d_p = 5 \mu\text{m}$).

The method was based on passing air through

a silica gel tube. Samples were desorbed with methanol and analyzed with HPLC-DAD. The procedure was validated according to Standard No. EN 482. The measuring range was $0.005 \div 0,1 \text{ mg/m}^3$, the limit of detection (LOD) was 1.55 ng/ml, the limit of quantification (LOQ) was 4.66 ng/ml, the overall accuracy of the method was 5.24% and the relative total uncertainty of the method was 11.5%.

The analytical method described in this paper makes it possible to selectively determine DNOC in workplace air in the presence of phenols and cresols at concentrations from 0.005 mg/m^3 (1/10 MAC value). The method is precise, accurate and it meets the criteria for procedures for measuring chemical agents listed in Standard No. EN 482.

The developed method of determining DNOC has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

WPROWADZENIE

2-Metylo-4,6-dinitrofenol (DNOC), znany jako dinitro-*o*-krezol, jest niepalnym ciałem stałym o żółtej barwie i charakterystycznym zapachu. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol jest substancją słabo rozpuszczalną w wodzie. Dobrze natomiast rozpuszcza się w: metanolu, eterze dietylowym, acetonie, kwasie octowym, benzenie i chloroformie. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol jest otrzymywany w wyniku nitrowania krezolu w obecności lodowatego kwasu octowego (CHEMPYL 2015; GESTIS 2015; *Montgomery* 1997; SCOEL 2004).

2-Metylo-4,6-dinitrofenol działa: owadobójczo, roztoczebójczo, grzybobójczo oraz chwastobójczo. Jest skutecznym insektycydem wobec szarańczy i innych owadów, a także selektywnym herbicydem w uprawie: zbóż, chmielu, winorośli i owoców. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol znajduje się w wykazie substancji biologicznie czynnych wchodzących w skład środków ochrony roślin, których stosowanie w Polsce jest zabronione (rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 13.01.2004 r.). 2-Metylo-4,6-dinitrofenol jest stosowany także

jako inhibitor polimeryzacji oraz produkt pośredni w przemyśle chemicznym. Jest również środkiem wspomagającym odchudzanie (SCOEL 2004; WHO 2000).

2-Metylo-4,6-dinitrofenol to substancja drażniąca i bardzo toksyczna o działaniu ogólnoustrojowym – szczególnie dla układu oddechowego i nerwowego, a także wątroby i nerek (CHEMPYŁ 2015). Substancja kumuluje się w organizmie, przy czym wydalanie następuje

bardzo powoli. Powoduje to przyspieszenie przemian tlenowych oraz wydzielanie ciepła przez organizm. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol wywołuje: tachykardię, methemoglobinemię i śpiączkę (Mikołajczak 2007). Zharmonizowaną klasyfikację 2-metylo-4,6-dinitrofenolu, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r., przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Zharmonizowana klasyfikacja 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008

Klasa zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Muta. 2 – działanie mutagenne na komórki rozrodcze, kategoria zagrożen 2.	H341 – podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne
Acute Tox. 2* – toksyczność ostra (wdychanie), kategoria zagrożen 2.	H330 – wdychanie grozi śmiercią
Acute Tox. 1 – toksyczność ostra (skórnice), kategoria zagrożen 1.	H310 – grozi śmiercią w kontakcie ze skórą
Acute Tox. 2* – toksyczność ostra (doustnie), kategoria zagrożen 2.	H300 – połknięcie grozi śmiercią
Skin Irrit. 2 – działanie drażniące na skórę, kategoria zagrożen 2.	H315 – działa drażniąco na skórę
Eye Dam. 1 – ryzyko poważnego uszkodzenia oczu, kategoria zagrożen 1.	H318 – powoduje poważne uszkodzenie oczu
Skin Sens. 1 – działanie uczulające na skórę, kategoria zagrożen 1.	H317 – może powodować reakcję alergiczną skóry
Aquatic Acute 1 – ostre zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria zagrożen 1.	H400 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne
Aquatic Chronic 1 – przewlekłe zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria zagrożen 1.	H410 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe zmiany

Objaśnienia:

* – minimum klasyfikacji dla danej kategorii.

Obowiązująca w Polsce wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) wynosi dla 2-metylo-4,6-dinitrofenolu – 0,05 mg/m³, a wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) – 0,4 mg/m³ (DzU 2014, poz. 817).

W Polsce zawartość 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu była oznaczana metodą spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie (Kijeńska 1987; PN-Z-04169-02:1986). Metoda polega na jednoczesnym pobraniu pyłu i par 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z powietrza na sączek włókninowy, połączony z płuczką

bełkotkową wypełnioną roztworem wodorotlenku sodu. Po pobraniu próbek powietrza 2-metylo-4,6-dinitrofenol z sączka włókninowego ekstrahowano roztworem z płuczki i uzyskano w ten sposób sól sodową 2-metylo-4,6-dinitrofenolu, której absorbancję mierzono przy długości fali analitycznej $\lambda = 370$ nm. Metoda umożliwia oznaczanie 0,03 mg 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w 1 m³ powietrza. W wyniku przeprowadzonego przeglądu norm przez Komitet Techniczny (nr 159 PKN – Polski Komitet Normalizacyjny) norma PN-Z-04169-02:1986 została wycofana ze zbioru norm polskich.

W metodzie wg NIOSH próbki powietrza zawierające 2-metylo-4,6-dinitrofenol przepuszczano przez filtr celulozowy połączony z płuczką szklaną wypełnioną glikolem etylenowym (NIOSH 1984). Po pobraniu próbki powietrza filtr przenoszono do płuczki i dodawano propan-2-ol. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol w tak uzyskanym roztworze oznaczano chromatograficznie (HPLC) przy długości fali analitycznej detektora spektrofotometrycznego

$\lambda = 254$ nm. Zakres pomiarowy tej metody wynosi $0,07 \div 0,62$ mg/m³ dla próbki powietrza 180 l.

Celem pracy było opracowanie takiej metody oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu, która umożliwi pobieranie próbek w powietrzu na stanowiskach pracy metodą dozymetrii indywidualnej i oznaczanie stężeń tej substancji w zakresie od 1/10 do 2 wartości NDS, czyli od $0,005 \div 0,1$ mg/m³.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem diodowym (DAD). Próbki wprowadzano za pomocą automatycznego podajnika próbek G2258-90010 (Agilent Technologies). Do sterowania procesem oznaczania i zbierania danych zastosowano oprogramowanie ChemStation. W badaniu zastosowano kolumnę chromatograficzną Ultra C18 o wymiarach: 250 x 4,6 mm o $dp = 5$ μ m, z przedkolumną o wymiarach: 10 x 4,0 mm (Restek, USA).

Do pobierania próbek powietrza pod kątem oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu wykorzystano aspiratory typu Gilian LFS-113 (Sensidyne, USA) o zakresie pracy $1 \div 350$ ml/min ($0,06 \div 21$ l/h). Do przeprowadzenia desorpcji analitów z sorbentów korzystano z wytrząsarki mechanicznej WL-2000 (JW Electronic, Polska). Wzorce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA). Próbki przechowywano w eksykatorze szafkowym serii EKS (WSL, Polska).

Roztwory przechowywano w chłodziarko-zamrażarce ARDO CO23B-2H (Merloni, Polska).

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: 2-metylo-4,6-dinitrofenol, 2-metylofenol (*o*-krezol), 3-metylofenol (*m*-krezol), 4-metylofenol (*p*-krezol), fenol (Sigma-Aldrich, Niemcy), metanol (Merck, Niemcy), kwas octowy (Riedel-de Haën, Niemcy), Phenol-Mix 5 – 2500 μ g w 1 ml acetonitrylu (Dr. Ehrenstorfer, Niemcy). Do badań stosowano wodę wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA). Ponadto stosowano: rurki adsorpcyjne zawierające od strony wlotu powietrza włókno i filtr z włókna szklanego oraz dwie warstwy (400/200 mg) żelu krzemionkowego nr kat. 226-10-03 (SKC Inc., USA) do pobierania próbek powietrza, a także naczynka do desorpcji o pojemności około 3 ml z nakrętkami i uszczelkami silikonowymi (wyposażone w zawór umożliwiający pobranie roztworu bez ich otwierania), szkło laboratoryjne oraz strzykawki do cieczy.

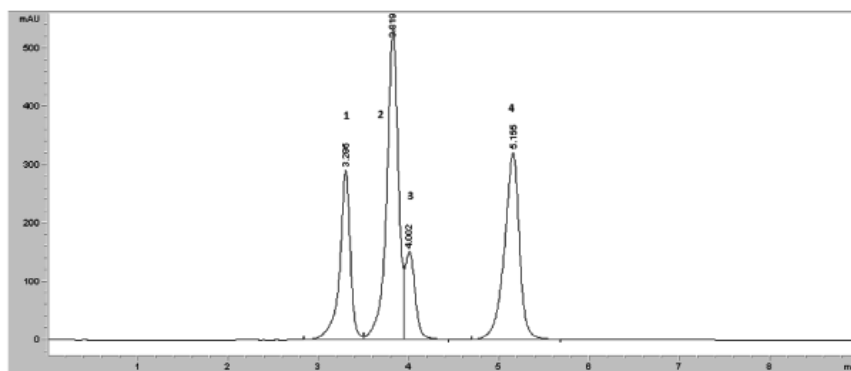
WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Warunki oznaczania chromatograficznego

Do oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) stosowano kolumnę z fazą oktadecylową Ultra C18 o długości 25 cm, średnicy wewnętrznej 4,6 mm i o uziarnieniu 5 μm , a jako fazę ruchomą: metanol i kwas octowy (roztwór 0,1-procentowy) w stosunku objętościowym 75: 25. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 ml/min. Do kolumny chromatografu wprowadzano próbkę o objętości 20 μl . Do detekcji wykorzystano detektor DAD, mierząc absorbancję przy długości fali analitycz-

nej – 266 nm.

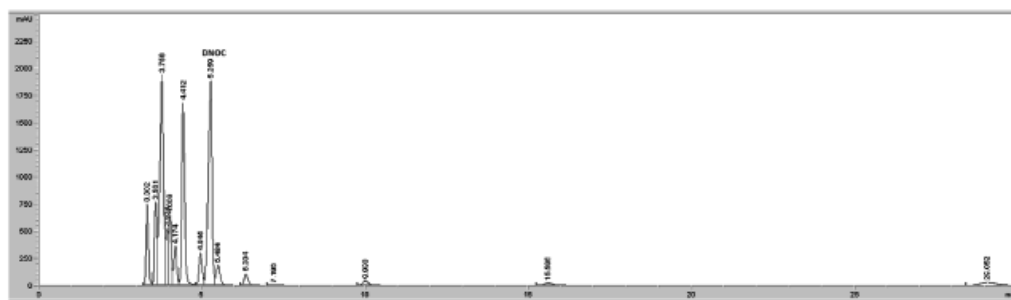
W opisanych warunkach 2-metylo-4,6-dinitrofenol może być oznaczany w obecności: metanolu, kwasu octowego, fenolu, *o*-, *m* i *p*-krezolu, 2-chlorofenolu, 2-bromofenolu, 4-chloro-3-metylofenolu, 2,4-dichlorofenolu, 2,4-dimetylofenolu, 2,4-dinitrofenolu, 2-nitrofenolu, 4-nitrofenolu, pentachlorofenolu, 2,3,4,6-tetrachlorofenolu i 2,4,6-trichlorofenolu. Chromatogram roztworu wzorcowego 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w obecności fenolu i krezoli przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Chromatogram roztworu wzorcowego 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) w obecności substancji współwystępujących. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 266 \text{ nm}$): 1) fenol, 2) *p*-i *m*-krezol, 3) *o*-krezol, 4) 2-metylo-4,6-dinitrofenol

Chromatogram certyfikowanego wzorca fenoli Phenol-Mix 5 (Dr. Ehrenstorfer), zawierającego oprócz 2-metylo-4,6-dinitrofenolu: fenol, *p*-, *m*-, *o*-krezol, 2-chlorofenol, 2-bromofenol, 4-chloro-

3-metylofenol, 2,4-dichlorofenol, 2,4-dimetylofenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorofenol, 2,3,4,6-tetrachlorofenol i 2,4,6-trichlorofenol, przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Chromatogram certyfikowanego wzorca fenoli - Phenol-Mix 5 (Dr. Ehrenstorfer) zawierającego oprócz 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC): fenol, *p*-, *m*-, *o*-krezol, 2-chlorofenol, 2-bromofenol, 4-chloro-3-metylofenol, 2,4-dichlorofenol, 2,4-dimetylofenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorofenol, 2,3,4,6-tetrachlorofenol, 2,4,6-trichlorofenol. Kolumna Ultra C18, detektor DAD ($\lambda = 266 \text{ nm}$)

Pobieranie próbek powietrza

Do pobierania próbek powietrza pod kątem oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) wytypowano dostępne w handlu rurki pochłaniające zawierające filtr z włókna szklanego i dwie warstwy (400/200 mg) żelu krzemionkowego. W celu ustalenia warunków pobierania próbek powietrza na filtr znajdujący się przed pierwszą warstwą żelu krzemionkowego wprowadzano po 5 i 10 μl 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w metanolu o stężeniu 3 mg/ml. Po odparowaniu metanolu przez rurki przepuszczano 60 l

powietrza ze stałym strumieniem objętości 20 i 10 l/h. Następnie przeprowadzono desorpcję 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z filtra – oddzielnie z pierwszej i drugiej warstwy żelu – za pomocą 2 ml metanolu. Tak uzyskane roztwory oznaczano chromatograficznie w warunkach opisanych wcześniej. Przeprowadzone badania wskazują, że rurka pochłaniająca zawierająca filtr i dwie warstwy żelu krzemionkowego zapewnia ilościowe wyodrębnienie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z powietrza. Przykładowe wyniki badań przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Przykładowe wyniki adsorpcji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) na filtrze z włókna szklanego i żelu krzemionkowym. Kolumna Ultra C18, detektor DAD

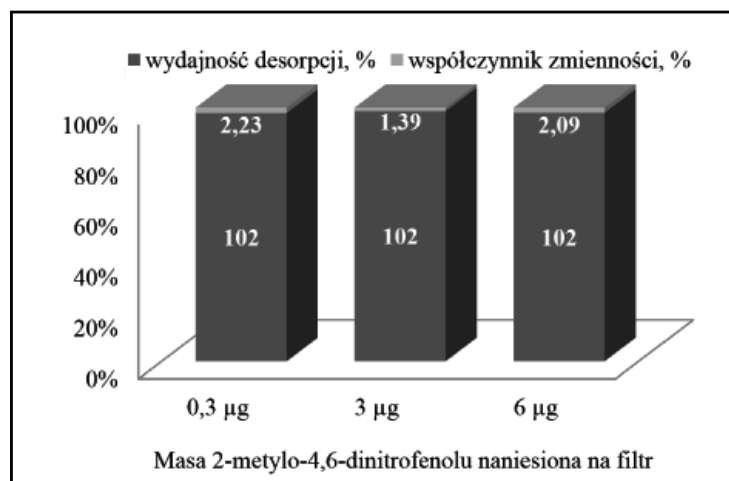
Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h	Czas pochłaniania, h	Przybliżone stężenie substancji w powietrzu, mg/m ³	Powierzchnia pików 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w roztworach po desorpcji		
			filtr	I warstwa żelu	II warstwa żelu
20	3	0,25	307,55	224,95	brak piku
20	3	0,5	666,9	421,9	brak piku
10	6	0,25	307,75	186,15	brak piku
10	6	0,5	495,7	455,0	brak piku

Badania stopnia desorpcji

Badanie stopnia desorpcji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) z filtra i żelu krzemionkowego przeprowadzono w następujący sposób: na filtry sześciu rurek pochłaniających, umieszczone przed 400 mg warstwą węgla aktywnego, nanoszono w trakcie pobierania próbek powietrza odpowiednio po: 1; 10 i 20 μl (razem osiemnaście rurek) roztworu 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w metanolu o stężeniu 0,3 mg/ml, co odpowiadało: 0,3; 3 i 6 μg 2-metylo-4,6-dinitrofenolu. Przez rurki przepuszczano 60 l powietrza ze strumieniem objętości 10 l/h. Następnie przeprowadzono desorpcję

2-metylo-4,6-dinitrofenolu (2 ml metanolu) z filtra – oddzielnie z pierwszej warstwy żelu i drugiej warstwy zabezpieczającej. Roztwory uzyskane po desorpcji oznaczano chromatograficznie. Wykonano także oznaczanie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w roztworach porównawczych wykonanych w identyczny sposób, ale bez sorbentów.

Wyniki badań wskazują na to, że metanol jest odpowiedni do desorpcji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z zastosowanych sorbentów. Średnia wydajność desorpcji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z filtra i żelu krzemionkowego wynosi 102%. Wyniki badań przedstawiono na rysunku 3.

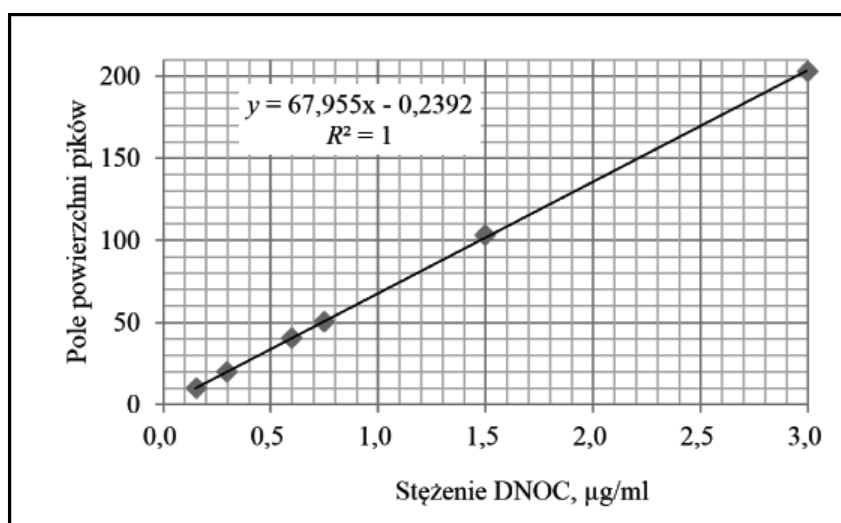


Rys. 3. Wydajność desorpcji uzyskana po naniesieniu: 0,3; 3 i 6 µg 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) na filtr znajdujący się przed pierwszą (400 mg) warstwą żelu krzemionkowego w rurce pochłaniającej, przepuszczeniu 60 l powietrza i desorpcji metanolem. Odchylenie standardowe ($n = 6$) wyrażone w procentach (współczynnik zmienności)

Kalibracja i precyzja

Oznaczanie kalibracyjne wykonano dla sześciu roztworów wzorcowych 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) w metanolu. Zakres stężeń tych roztworów wzorcowych wynosił $0,15 \div 3 \mu\text{g/ml}$. Sporządzono trzy serie roztworów kalibracyjnych, które poddano analizie chromatograficznej. Do chromatografu wprowadzono po 20 µl roztworów wzorcowych o wzrastających stężeniach. Następnie

sporządzono wykres zależności średniej powierzchni pików 2-metylo-4,6-dinitrofenolu od jego stężeń w roztworach wzorcowych (rys. 4.). Współczynnik nachylenia „ b ” krzywej kalibracji o równaniu $y = bx + a$ charakteryzujący czułość metody wynosi 67,95. Liniowość krzywej wzorcowej jest charakteryzowana wartością współczynnika korelacji R , który wynosi 1.



Rys. 4. Wykres zależności powierzchni pików od stężenia 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) w metanolu. Kolumna Ultra C18, detektor DAD

Precyzję oznaczeń kalibracyjnych wyznaczono na podstawie trzech serii po osiem roztworów roboczych o stężeniach kolejno: 0,15 (I seria); 1,5 (II seria) i 3 µg/ml (III seria). Po wykonaniu analizy chromatograficznej dla każdej serii obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężenia wyniosły odpowiednio: 1,99; 1,16 i 1,41%.

Badanie trwałości próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza, w zależności od czasu ich przechowywania, bada-

no w następujący sposób: na filtr umieszczony w rurce pochłaniającej наносono po 5 µl roztworu 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) w metanolu o stężeniu 0,6 mg/ml. Próbki (dwie sztuki) analizowano natychmiast po przepuszczeniu 60 l powietrza oraz po: trzech, pięciu i siedmiu dniach przechowywania w chłodziarce (4 ± 2 °C) i w laboratorium (23 ± 2 °C). Przykładowe wyniki badań trwałości próbek przechowywanych w laboratorium i w chłodziarce przedstawiono w tabeli 3.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że próbki są trwałe co najmniej siedem dni bez względu na sposób ich przechowywania.

Tabela 3.

Badanie trwałości próbek powietrza zawierających 3 µg 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (DNOC) przechowywanych w chłodziarce i w laboratorium (eksykator). HPLC-DAD, kolumna Ultra C18

Numer rurki	Czas przechowywania, liczba dni	Miejsce przechowywania	Średnie pola powierzchni pików	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności, %
1	0	laboratorium	114,50	115,15	0,92	0,80
2			115,80			
1	3	laboratorium	114,85	113,75	1,56	1,37
2			112,65			
1	3	chłodziarka	116,10	113,30	3,96	3,49
2			110,50			
1	5	laboratorium	117,50	116,40	1,56	1,34
2			115,30			
1	5	chłodziarka	116,2	115,25	1,34	1,17
2			114,30			
1	7	laboratorium	112,6	114,25	2,33	2,04
2			115,9			
1	7	chłodziarka	117,3	116,90	0,57	0,48
2			116,5			

Walidacja

Granice wykrywalności (LOD) oraz granice oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie wyników analiz (dziesięć niezależnych pomiarów powierzchni piku o czasie retencji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu) uzyskanych z trzech niezależnie przygotowanych ślepych prób.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- granica wykrywalności, LOD 1,55 ng/ml
- granica oznaczalności, LOQ 4,66 ng/ml
- całkowita precyzja badania, V_c 5,24%
- względna niepewność całkowita 11,5%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano nową metodę oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie stężeń $0,005 \div 0,1 \text{ mg/m}^3$.

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w badanym powietrzu 2-metylo-4,6-dinitrofenolu na filtrze z włókna szklanego i żelu krzemionkowym, desorpcji metanolem i analizie chromatograficznej (HPLC-DAD) otrzymanego roztworu. Zastosowana kolumna oktadecylowa Ultra C18 o długości 250 mm umożliwia selektywne oznaczanie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w obecności: metanolu, kwasu octowego, fenolu, 2-metylofenolu (*o*-krezolu), 3-metylofenolu (*m*-krezolu), 4-metylofenolu (*p*-krezolu), 2-bromofenolu, 4-chloro-3-metylofenolu, 2-chlorofenolu, 2,4-dichlorofenolu, 2,4-dimetylofenolu, 2,4-dinitrofenolu, 2- i 4-nitrofenolu, pentachlorofenolu, 2,3,4,6-tetrachlorofenolu i 2,4,6-trichlorofenolu.

Rurki pochłaniające, zawierające filtr z włókna szklanego i dwie warstwy (400/200 mg) żelu

krzemionkowego, zapewniają ilościowe wyodrębnienie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu z badanego powietrza i umożliwiają pobieranie próbek powietrza zawierającego 2-metylo-4,6-dinitrofenol zgodnie z zasadami dozymetrii indywidualnej.

Walidację opracowanej metody wykonano zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482.

Uzyskano dobre parametry walidacji:

- precyzja całkowita metody 5,24%
- względna niepewność całkowita 11,5%.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie badanej substancji na poziomie 1/10 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia i może być wykorzystana do oceny narażenia zawodowego.

Opracowaną metodę oznaczania 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

- CHEMPYŁ (2015) Baza wiedzy o zagrożeniach chemicznych i pyłowych. Warszawa, CIOP-PIB.
- GESTIS (2015) Substance database. BG Institute for Occupational Safety and Health. Sankt Augustin, Germany.
- Kijeńska D.* (1987) Oznaczanie stężeń 4,6-dwunitroortokrezolu w powietrzu metodą spektrofotometrii w zakresie promieniowania nadfioletowego. Prace CIOP nr 132, 43–48.
- Mikołajczak B.* (2007) Rakotwórcza woda. Hydropure Polska Sp. z o.o. i Stowarzyszenie Czysta Woda. Wrocław.
- Montgomery J.H.* (1997) Agrochemicals Desk Reference. 2nd edition. Lewis Publishers. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA.
- NIOSH (1984) Dinitro-*o*-cresol. Method no. S166. National Institute for Occupational Safety and Health. Manual of analytical methods. 2nd ed. vol 5. Washington, DC, USA.
- PN-EN 482:2012 Narażenie na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.
- PN-Z-04169-02:1986 Ochrona czystości powietrza. Badania zawartości 4,6-dwunitroortokrezolu. Oznaczanie 4,6-dwunitroortokrezolu na stanowiskach pracy metodą spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie.
- Rozporządzenie ministra pracy i polityki społecznej z dnia 6.06.2014 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 2014, poz. 817.
- Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 13.01.2004 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych zasad wydawania zezwolenia na dopuszczenie środków ochrony roślin do obrotu i stosowania. DzU nr 16, poz. 162.
- SCOEL (2004) Recommendation from the Scientific Committee for Occupational Exposure Limits for 4,6-dinitro-*o*-cresol. SCOEL/SUM/60. Social Europe.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (zwane rozporządzeniem GHS). Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r., L 353.
- WHO (2000) World Health Organisation. Environmental Health Criteria 220, dinitro-ortho-cresol.

**PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA
2-METYLO-4,6-DINITROFENOLU
W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY**

1. Zakres stosowania metody

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (nr CAS: 1534-52-1) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,005 mg/m³.

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 obecnego w badanym powietrzu 2-metylo-4,6-dinitrofenolu na filtrze z włókna szklanego i żelu krzemionkowym, desorpcji metanolem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Odczynniki, roztwory i materiały

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

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

Czynności związane z rozpuszczalnikami organicznymi należy wykonywać pod spraw-

nie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Pozostałe po analizie roztwory odczynników i wzorców należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się utylizacją.

4.1. Metanol

4.2. 2-Metylo-4,6-dinitrofenol

4.3. Kwas octowy – roztwór o ułamku objętościowym 0,1%

4.4. Roztwór wzorcowy podstawowy 2-metylo-4,6-dinitrofenolu

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 100 ml należy odważyć 30 mg 2-metylo-4,6-dinitrofenolu wg punktu 4.2., uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 4.1. i dokładnie wymieszać. Stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,3 mg/ml.

4.5. Roztwór wzorcowy pośredni

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzyć 1 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 4.4. i uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 4.1. Stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,03 mg/ml.

4.6. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 2 ml odmierzyć kolejno: 10; 20; 40; 50; 100 i 200 µl roztworu wzorcowego pośredniego wg punktu 4.5., uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 4.1. i wymieszać. Zawartość 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w 1 ml tak przygotowanych roztworów wynosi odpowiednio: 0,15; 0,3; 0,6; 0,75; 1,5 i 3 µg.

Roztwory przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej przez siedem dni.

4.7. Rurki pochłaniające

Stosować dostępne w handlu rurki szklane zawierające filtr z włókna szklanego oraz dwie

warstwy żelu krzemionkowego (400 i 200 mg, rozdzielone i ograniczone włóknem szklanym). Jeżeli w rurce pochłaniającej przed filtrem znajduje się dodatkowo włókno szklane (od strony wlotu powietrza), należy je usunąć przed pobieraniem próbek powietrza. Każdą używaną partię rurek należy zbadać wg punktu 10.

5. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz wymieniony niżej:

5.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem diodowym, umożliwiający wykonanie oznaczeń przy długości fali 266 nm.

5.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.: kolumna o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm wypełniona fazą oktadecylową o uziarnieniu 5 µm.

5.3. Strzykawki do cieczy

Strzykawki do cieczy o pojemności 10 ÷ 2,5 ml.

5.4. Naczynka do desorpcji

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

5.5. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 6.

6. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez rurkę pochłaniającą wg punktu 4.7. przepuścić do 60 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 20 l/h.

Pobrane próbki zachowują trwałość co naj-

mniej przez siedem dni.

7. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby uzyskać rozdział 2-metylo-4,6-dinitrofenolu od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 5.2., oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

- faza ruchoma:
metanol: kwas octowy
(wg punktu 4.3.) 75: 25
- natężenie przepływu
strumienia fazy ruchomej 1 ml/min
- długość fali analitycznej
detektora diodowego 266 nm
- objętość dozowanej próbki 20 µl.

8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 20 µl roztworów wzorcowych roboczych 2-metylo-4,6-dinitrofenolu wg punktu 4.6. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w mikrogramach na mililitr, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

9. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza przesypać oddzielnie każdą warstwę żelu krzemionkowego z rurki pochłaniającej do naczynek wg punktu 5.4., dodając do dłuższej warstwy żelu także filtr z włókna szklanego znajdujący się przed

tą warstwą. Następnie dodać strzykawką wg punktu 5.3. po 2 ml metanolu wg punktu 4.1., naczynka szczelnie zamknąć i pozostawić na 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Następnie pobrać po 20 µl roztworu znad żelu i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 7. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików 2-metylo-4,6-dinitrofenolu wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż ±5% tej wartości. Z krzywych wzorcowych odczytać zawartość oznaczanej substancji w 1 ml badanego roztworu.

W taki sam sposób wykonać oznaczanie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w roztworze znad krótszej warstwy żelu. Ilość substancji oznaczonej w krótszej warstwie żelu nie powinna przekraczać 10% ilości oznaczonej w dłuższej warstwie. W przeciwnym razie wynik należy traktować jako orientacyjny.

10. Wyznaczanie współczynnika desorpcji

Do pięciu naczynek wg punktu 5.4. przenieść filtr z włókna szklanego i przesytać dłuższą (400 mg) warstwę żelu krzemionkowego z rurki pochłaniającej wg punktu 7. Następnie dodać po 10 µl roztworu wzorcowego pośredniego wg punktu 4.5. W szóstym naczynku przygotować próbkę kontrolną zawierającą tylko filtr i żel. Naczynka szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać strzykawką wg punktu 5.3. po 2 ml metanolu wg punktu 4.1. Naczynka ponownie zamknąć i przeprowadzić desorpcję w ciągu 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Jednocześnie wykonać oznaczanie badanej substancji co najmniej w trzech roztworach porównawczych przygotowanych przez dodanie do 2 ml metanolu wg punktu 4.1. po 10 µl roztworu wg punktu 4.5. Tak uzyskane

roztwory badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 7.

Współczynnik desorpcji dla 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (d) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

- P_d – średnia powierzchnia pików 2-metylo-4,6-dinitrofenolu na chromatogramach roztworów po desorpcji,
- P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji 2-metylo-4,6-dinitrofenolu na chromatogramach roztworu kontrolnego,
- P_p – średnia powierzchnia pików 2-metylo-4,6-dinitrofenolu na chromatogramach roztworów porównawczych

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników desorpcji dla 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (\bar{d}), jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Współczynnik desorpcji należy wyznaczać dla każdej nowej partii rurek pochłaniających.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

- c_1 – stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w roztworze znad filtra z włókna szklanego i pierwszej warstwy żelu odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- c_2 – stężenie 2-metylo-4,6-dinitrofenolu w roztworze znad drugiej warstwy żelu odczytana z krzywej wzorcowej,

- w mikrogramach na mililitr,
- V – objętość powietrza przepuszczonego przez rurkę pochłaniającą, w litrach,
- \bar{d} – średnia wartość współczynnika desorpcji wyznaczana zgodnie z punktem 10.
- 2 – ilość rozpuszczalnika stosowanego do desorpcji, w mililitrach.