

Fenoloftaleina – frakcja wdychalna

Metoda oznaczania w powietrzu
na stanowiskach pracy¹

Phenolphthalein – inhalable fraction
Determination method in workplace air

mgr MARZENA BONCZAROWSKA
e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl
mgr inż. KAROLINA MIKOŁAJEWSKA
e-mail: karolina.mikolajewska@imp.lodz.pl
dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI
e-mail: slawomir.brzeznicki@imp.lodz.pl
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Numer CAS 77-09-8

Słowa kluczowe: fenoloftaleina, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy.

Keywords: phenolphthalein, analytical method, liquid chromatography, workplace air.

Streszczenie

Fenoloftaleina w temperaturze pokojowej występuje w postaci bezwonnych, bezbarwnych lub żółtawych kryształów. Substancja jest związkiem chemicznym powszechnie stosowanym w laboratoriach jako wskaźnik pH. Fenoloftaleina jest również stosowana do oceny stopnia nasycenia betonu ditlenkiem węgla lub podczas wytrawiania powierzchni metali przed malowaniem proszkowym. Narażenie na fenoloftaleinę może powodować podrażnienia skóry. Zgodnie z klasyfikacją Unii Europejskiej fenoloftaleina została zaklasyfikowana jako związek prawdopodobnie

rakotwórczy (kategoria zagrożenia 1.B) i mutageny (kategoria zagrożenia 2.) dla ludzi, może również wpływać negatywnie na płodność.

Celem pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania stężeń fenoloftaleiny w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od 1/10 do 2 zaproponowanej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN EN 482+A1:2016-01.

Do badań wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotome-

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach IV etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, dofinansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Naukowe Centrum Badań i Rozwoju.

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

tryczną (UV-VIS). Rozdziałów chromatograficznych dokonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 150 mm × 3 mm o uziarnieniu 3 μm. Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę metanolu i wody z dodatkiem kwasu octowego.

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnej w powietrzu fenoloftaleiny na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny metanol: woda z dodatkiem kwasu octowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu. Średnia wartość wydajności odzysku fenoloftaleiny z filtrów wynosi 99,9%. Zależność wskazań detektora w funkcji stężeń fenoloftaleiny ma charakter liniowy ($r = 0,9997$) w zakresie stężeń

0,008 ÷ 0,4 mg/ml (0,33 ÷ 16,7 mg/m³ dla próbki powietrza 240 l). Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego wynoszą odpowiednio 0,33 i 0,99 μg/ml.

Opisana w niniejszym artykule metoda analityczna pozwala na oznaczanie fenoloftaleiny w środowisku pracy. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN482+A1:2016-01 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych.

Opracowaną metodę oznaczania fenoloftaleiny w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

Summary

Phenolphthalein at room temperature is present in a form of solid, odorless, white or yellowish crystals. It is commonly used in analytical laboratories as a pH indicator. It is also used to determine the depth of concrete carbonation or for metal surface preparation in galvanizing and powder painting processes. Exposure to phenolphthalein can cause skin irritation. In the European Union, phenolphthalein has been classified as carcinogenic category 1.B and mutagenic category 2. It is also suspected to have a negative effect on human fertility.

The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for determining phenolphthalein concentrations in the workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of Standard No. PN-EN 482.

The study was performed using a liquid chromatograph with spectrophotometric detection. All chromatographic analysis were performed with Supelcosil LC 18 150 × 3 mm analytical column, which was eluted with mixture of methanol, water and acetic acid.

The method is based on the collection of phenolphthalein on glass fiber filter, extraction with methanol, water and acetic acid mixture, and chromatographic determination of resulted solution with HPLC technique. The average extraction efficiency of phenolphthalein from filters was 99.9%. The method is linear ($r = 0.9997$) within the investigated working range 0.008–0.4 mg/ml (0.33–16.7 mg/m³ for a 240-L air sample). Calculated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.33 μg/ml and 0.99 μg/ml, respectively.

The analytical method described in this paper enables determination of phenolphthalein in workplace air. The method is precise, accurate and it meets the criteria for procedures for measuring chemical agents listed in Standard No. PN-EN 482+A1:2016-01. The method can be used for assessing occupational exposure to phenolphthalein and associated risk to workers' health. The developed method of determining phenolphthalein has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

WPROWADZENIE

Fenoloftaleina jest otrzymywana w reakcji kondensacji fenolu z bezwodnikiem ftalowym w temperaturze 120 °C (w obecności kwasu siarkowego). Związek w temperaturze pokojowej występuje w postaci bezwonnych, bezbarwnych lub żółtawych kryształów. Jest substancją nietłną, praktycznie nierozpuszczalną w wodzie (400 mg/l). Nie rozpuszcza się w takich rozpuszczalnikach, jak benzen czy eter naftowy. Fenoloftaleina jest słabo rozpuszczalna w: disiarczku węgla, eterze etylowym, chloroformie i toluenie. Dobrze natomiast rozpuszcza się w eta-

nolu i acetonie. Substancja jest związkiem chemicznym powszechnie stosowanym w laboratoriach jako wskaźnik pH do określania stopnia wysycenia betonu ditlenkiem węgla oraz podczas wytrawiania powierzchni metali przed malowaniem proszkowym. Fenoloftaleina do końca XX wieku była stosowana jako środek przeczyszczający (HSDB 2009).

Najbardziej prawdopodobne drogi narażenia pracowników na fenoloftaleinę to: narażenie inhalacyjne, droga pokarmowa oraz bezpośredni kontakt ze skórą. Narażenie zawodowe na fenoloftaleinę może

być powodem podrażnienia skóry. Narażenie drogą pokarmową może prowadzić do: zaburzeń gastrycznych, przewlekłych zaparć, podrażnień i dysfunkcji błony śluzowej jelit oraz zaburzeń wchłaniania pokarmów. U osób przyjmujących środki przeczyszczające (zwierające fenoloftaleinę) obserwowano nieistotny statystycznie wzrost ryzyka wystąpienia raka jelita (*Konieczko 2017*). Działanie rakotwórcze fenoloftaleiny zostało stwierdzone w badaniach na zwierzętach. Na podstawie wyników badań eksperci IARC zakwalifikowali tę substancję do grupy 2.B, tj. do grupy czynników przypuszczalnie rakotwórczych dla ludzi (IARC 2000). Do podobnych wniosków

doszli również eksperci Unii Europejskiej, klasyfikując fenoloftaleinę do kategorii zagrożenia 1.B.

Zgodnie z przepisami ustawy z dnia 25.02.2011 r. o substancjach chemicznych i ich mieszaninach wraz z tekstem jednolitym (DzU 2018, poz. 143) fenoloftaleina została zaklasyfikowana w wykazie substancji niebezpiecznych jako substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1.B. Zharmonizowaną klasyfikację fenoloftaleiny, zgodne z tabelą 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Zharmonizowana klasyfikacja fenoloftaleiny zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Carc. 1B – rakotwórczość (kategoria zagrożenia 1.B)	H341 – podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne
Muta 2 – działa mutagennie na komórki rozrodcze (kategoria zagrożenia 2.)	H350 – może powodować raka
Repr. 2 – działa szkodliwie na rozrodczość (kategoria zagrożenia 2.)	H361f – podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność

W 2017 r. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN zaproponował przyjęcie wartości NDS dla frakcji wdychalnej fenoloftaleiny na poziomie 8 mg/m³, stwierdzając jednocześnie, że nie ma merytorycznych podstaw do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh), (*Konieczko 2017*).

Celem pracy było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania fenoloftaleiny w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary stężeń tego związku, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały i odczynniki

W badaniach zastosowano: metanol (J.T. Baker), etanol (J.T. Baker), fenoloftaleinę (Merck), kwas octowy (POCh) oraz wodę o czystości do HPLC pochodzącą ze stacji uzdatniania wody firmy Millipore.

Aparatura

Do badań wykorzystano: chromatograf cieczowy firmy Waters model Alliance 2695 LC System wyposażony w pompę początkową, detektory Waters PDA 2996 (detektor diodowy UV-VIS), kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 o wymiarach 150 mm × 3,0 mm, 3 µm wypełnioną modyfikowanym żelom krzemionkowym typu C18, termostat kolumny ana-

litycznej, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i akwizycji danych. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory indywidualne Gilian (GilAir 3), głowicę do pobierania frakcji wdychalnej, a do ekstrakcji próbek – wyciągarkę rotacyjną. Substancje wzorcowe odważano na wadze analitycznej Sartorius Research.

Warunki oznaczania chromatograficznego

Na podstawie danych literaturowych do opracowania metody wykorzystano technikę chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Technika ta jest powszechnie wykorzystywana do oznaczania stężeń fenoloftaleiny w preparatach leczniczych

i suplementach diety (jako zanieczyszczenie) lub materiale biologicznym (Khazan i in. 2014; Rebiere i in. 2012; Torrado i in. 1995; Wang i in. 2014; Wilson, Masse 2016; de Wolff i in. 1981; Zeng i in. 2016).

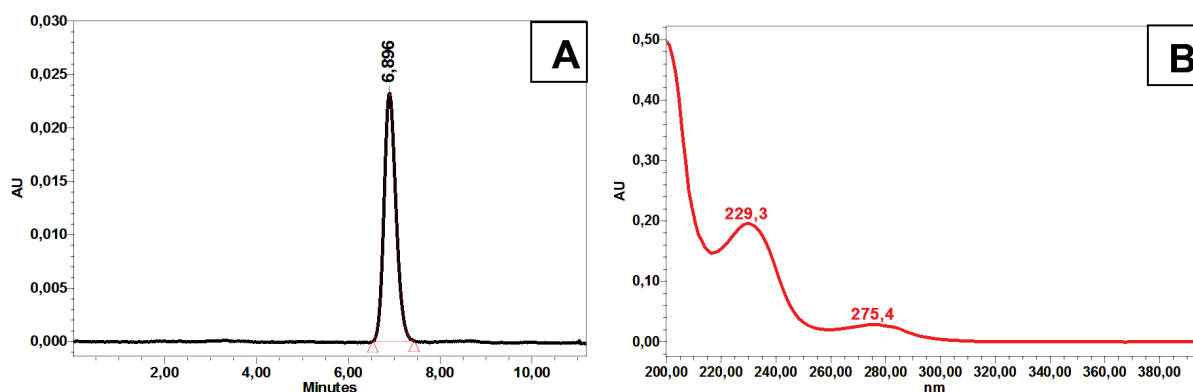
Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy fenoloftaleiny techniką HPLC wykonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 150 × 3,0 mm, ziarno 3 μm. Jako fazę ruchomą (elucja izokratyczna) zastosowano mieszaninę metanolu i wody z dodatkiem kwasu octowego.

Właściwości fizykochemiczne fenoloftaleiny wskazują, że w środowisku pracy związek ten może występować głównie w postaci pyłu. Do pobierania próbek powietrza można zastosować filtry umożliwiające zatrzymanie obecnego w powietrzu związku. Z uwagi na właściwości spektralne fenoloftaleiny (absorpcja w ultrafiolecie) do opracowania metody wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (Rebiere i in. 2012; Torrado i in. 1995; Wang i in. 2014).

Zawodowe narażenie na fenoloftaleinę występuje głównie w laboratoriach oraz w zakładach zajmu-

jących się obróbką powierzchni przed malowaniem proszkowym lub galwanizowaniem (Konieczko 2017). Szczególnie w laboratoriach lista substancji, które mogą współwystępować w środowisku pracy obok fenoloftaleiny, jest trudna do oszacowania. Dane literaturowe wskazują, iż możliwe jest selektywne oznaczenie fenoloftaleiny nawet w wieloskładnikowych mieszaninach (Wang i in. 2014; Zeng i in. 2016). Z tego względu, zaproponowane w niniejszej pracy warunki analityczne należy traktować jako przykładowe i w razie konieczności modyfikować skład fazy ruchomej lub zastosować kolumnę analityczną wypełnioną fazą o innej polarności.

Przedstawiona na rysunku 1. analiza widmowa wzorca fenoloftaleiny wykazała, iż optymalną, zapewniającą odpowiednią czułość oznaczeń na detektorze UV-VIS jest długość fali analitycznej ($\lambda = 230$ nm). Zastosowanie w oznaczeniach fenoloftaleiny kolumny Supelcosil LC-18 oraz podanych w tabeli 2. warunków rozdzielania chromatograficznego umożliwia selektywne oznaczenie tego związku.



Rys. 1. Chromatogram (A) i widmo UV (B) fenoloftaleiny w zakresie 200 ÷ 400 nm (A). Detektor DAD

Tabela 2.

Warunki pracy chromatografu cieczowego Waters Alliance 2695

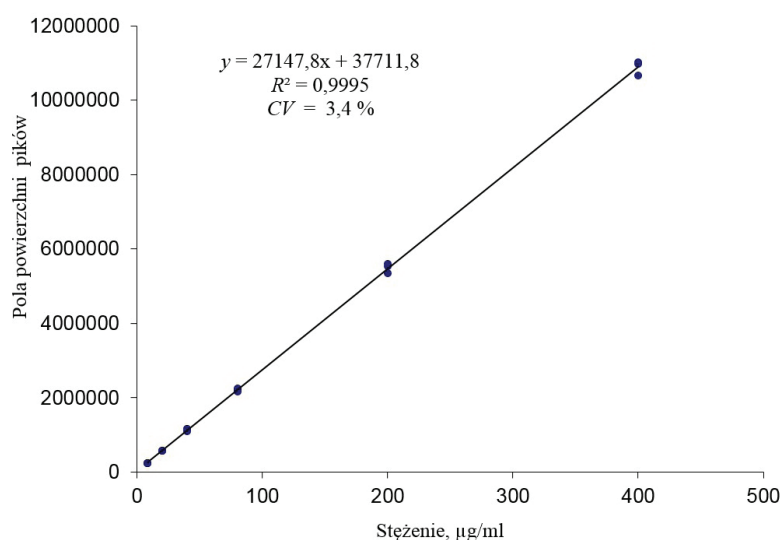
Kolumna analityczna Supelcosil™ LC-18 150 mm × 3 mm × 3 μm		
Faza ruchoma	Metanol + kwas octowy (9:1 v:v)	Woda: kwas octowy (9:1 v:v)
Program – izokratycznie (v:v)	50%	50%
Strumień objętości	0,25 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	230 nm	
Objętość próbki	5 μl	

Badanie zakresu stosowania metody analitycznej

Celem określenia zakresu roboczego i liniowości metody przygotowano trzy serie po siedem filtrów, na które naniesiono za pomocą pipety automatycznej po 100 µl etanolowych roztworów wzorcowych o stężeniach: 0; 0,8; 2; 4; 8; 20 i 40 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry z naniesionymi wzorcami umieszczono w naczynkach o pojemności 20 ml i ekstrahowano za pomocą wytrząsarki rotacyjnej 10 ml mieszaniny metanol: woda: kwas octowy (49: 49: 2; v:v) przez 60 min. Uzyskane ekstrakty przepuszczano przez filtry PTFE o średnicy 25 mm

i średnicy porów 0,45 µm. Część oczyszczonych ekstraktów przenoszono do wial o pojemności 2 ml i poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rysunku 2. Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi detektora od stężenia fenoloftaleiny ma charakter liniowy w zakresie 8 ÷ 400 µg/ml, co odpowiada stężeniom 0,33 ÷ 16,7 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 240 l). Zależność tę opisuje równanie $y = 27147,8x + 37711,8$. Współczynnik korelacji (r) wynosi 0,9997, a współczynnik zmienności $CV = 3,4\%$.



Rys. 2. Zależność odpowiedzi detektora UV-VIS na analizowane stężenia fenoloftaleiny w zakresie 8 ÷ 400 µg/ml

Dobór warunków pobierania próbek powietrza

Zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482+A1:2016-01 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu już od 1/10 ÷ 2 wartości obowiązującego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Próbki powietrza do oznaczania fenoloftaleiny należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie PN-Z 04008-7:2002. Metoda zakłada pobieranie trzech próbek powietrza w ciągu zmiany roboczej.

Podczas pobierania próbek powietrza stosowano filtry z włókna szklanego Whatman GF/A o średnicy 25 mm oraz odpowiednią głowicę, która umożliwia pobór frakcji wdychalnej.

Badanie warunków pobierania, ekstrakcji i przechowywania próbek powietrza do oznaczeń fenoloftaleiny

Do wyznaczenia współczynnika odzysku fenoloftaleiny z filtrów poddanych aeracji przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 100 µl roztworów wzorcowych o stężeniach: 2; 8 i 40 mg/ml. Filtry umieszczono w polipropylenowych głowicach przeznaczonych do pobierania próbek frakcji wdychanej, połączono z aspiratorami, a następnie przez 120 min przepuszczano przez nie powietrze ze strumieniem objętości 2 l/min. Po tym czasie filtry umieszczono w naczynkach o pojemności 20 ml i ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanolu, wody i kwasu octowego (49:49:2 v:v) przez 60 min za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Ekstrak-

ty przesączano przez filtry strzykawkowe (25 mm, średnica porów 0,45 μm), a następnie poddawano analizie chromatograficznej. W celu sprawdzenia strat analitu podczas pobierania próbek, wielkości pól powierzchni pików fenoloftaleiny uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów, na które naniesiono takie same ilości fenoloftaleiny i nie przepuszczono powietrza.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 3. Przeprowadzone badania wykazały, że przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje istotnych ilościowych strat związku naniesionego na filtr. Wartości wydajności ekstrakcji dla związku naniesionego na filtr w ilości: 0,2; 0,8 i 4 mg/filtr wynoszą odpowiednio: 98,1; 102,3 i 100,4% (średnia 99,9%, $CV = 1,8\%$).

Tabela 3.

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń fenoloftaleiny (detektor UV-VIS)

Medium pochłaniające	Zawartość fenoloftaleiny na filtrze, mg	Pole powierzchni pików		Wydajność ekstrakcji, %	Średnia wartość wydajności ekstrakcji, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,2	565236,0	554696,5	98,3	98,3
		564394,0	561649,0	99,5	
		563818,0	549880,0	97,4	
			559821,5	99,2	
			546290,0	96,8	
			554607,0	98,3	
			<i>SD</i> 1,2		
			<i>CV</i> 1,2		
	0,8	2137356,0	2154655,0	99,4	102,3
		2140926,0	2170134,0	100,1	
		2224996,0	2224996,0	102,6	
			2225013,0	102,6	
			2225053,0	102,6	
			2201668,0	101,6	
			<i>SD</i> 0,6		
			<i>CV</i> 0,6		
	4	10643807,9	10650776,2	100,1	100,4
		10623440,1	10647119,0	100,0	
10668320,9		10519962,0	98,8		
		10548743,1	99,1		
		10761306,5	101,1		
		10761017,6	101,1		
		<i>SD</i> 1,2			
		<i>CV</i> 1,2			
Średnia wydajność odzysku, \bar{S}_r , %		99,9			
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>		1,8			
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		1,8			

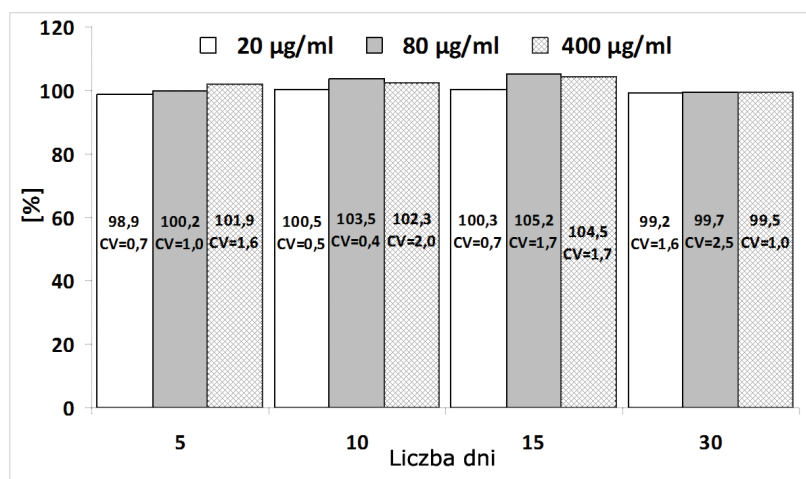
Celem zbadania trwałości fenoloftaleiny pobranej na filtry z włókna szklanego przygotowano cztery serie po osiemnaście filtrów, na które naniesiono po 100 μl roztworów wzorcowych o stężeniach: 2; 8 i 40 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, filtry umieszczano w hermetycznych pojemnikach i przechowywano w chłodziarce. Po: 5, 10, 15 i 30 dniach

przechowywania analizie poddano po sześć filtrów z każdego stężenia. Filtry umieszczono w wialach o pojemności 20 ml i ekstrahowano 10 ml mieszaniny metanolu wody i kwasu octowego (49: 49:2 v:v) przez 60 min za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Przesączone przez filtry strzykawkowe (25 mm, ϕ porów 0,45 μm) ekstrakty poddano analizie

chromatograficznej. Uzyskane wartości pól powierzchni pików fenoloftaleiny porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów przygotowanych w dniu badania.

Wyniki badań warunków przechowywania próbek przedstawiono na rysunku 3. Z przedstawionych danych wynika, iż próbki fenoloftaleiny pobrane na

filtry, umieszczone w hermetycznych pojemnikach, przechowywane w chłodziarce, są trwale przez co najmniej 30 dni. Po tym okresie przechowywania próbek średnia zawartość fenoloftaleiny na filtrach z trzech analizowanych stężeń wynosiła 99,5% ($CV = 1,7\%$ dla $n = 64$ analiz).

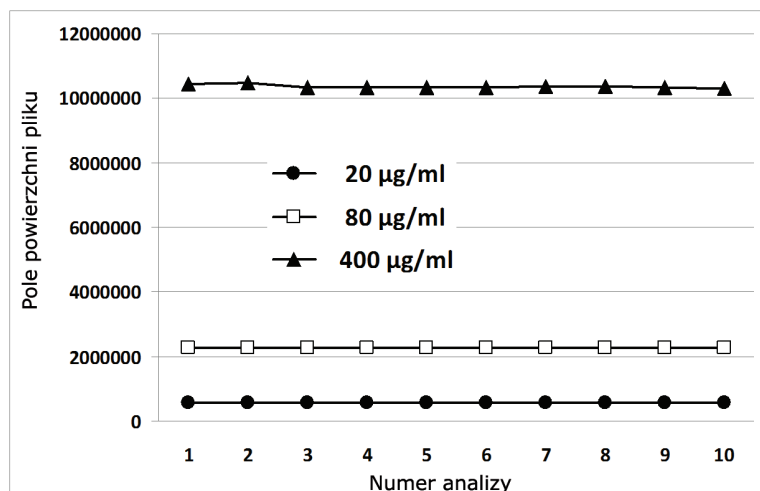


Rys. 3. Wpływ czasu i warunków przechowywania próbek powietrza do oznaczeń fenoloftaleiny

Precyzja oznaczeń fenoloftaleiny

Celem zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia, przygotowano trzy roztwory wzorcowe fenoloftaleiny o stężeniach: 20; 80 i 400 µg/ml. Zawartość fenoloftaleiny w roztworach oznaczano chromatograficznie, analizując każdy wzorec dziesięciokrotnie.

Wyniki badania precyzji metody przedstawiono graficznie na rysunku 4. Odchylenia standardowe rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 20; 80 i 400 µg/ml, wynoszą odpowiednio: 0,4; 0,3 i 0,6%.



Rys. 4. Badanie precyzji analiz z zastosowaniem detektora UV-VIS

WALIDACJA

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482+A1:2016-01.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy $0,33 \div 16,7 \text{ mg/m}^3$
(dla próbki powietrza 240 l)

- granica oznaczalności, X_{ozn} 0,99 $\mu\text{g/ml}$
- granica wykrywalności, X_{gw} 0,33 $\mu\text{g/ml}$
- współczynniki korelacji charakteryzujące liniowość krzywych wzorcowych, r 0,9997
- całkowita precyzja badania, V_c 5,6%
- niepewność całkowita metody 11,1%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania fenoloftaleiny w powietrzu środowiska pracy z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Zastosowane warunki analizy chromatograficznej (kolumna analityczna Supelcosil LC-18 o wymiarach $150 \times 3,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, eluowana mieszaniną metanolu i wody z dodatkiem kwasu octowego) pozwalają na oznaczenie tego związku w czasie krótszym niż 10 min.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie stężeń fenoloftaleiny w powietrzu środowiska pracy w zakresie $0,33 \div 16,7 \text{ mg/m}^3$, tj. od 1/24 do 2,1 wartości proponowanego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482+A1:2016-01 i opisana w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2009). National Library of Medicine. Phenolphthalein [dostęp: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?/temp/~j2zcSb:1>].

IARC, International Agency for Research on Cancer (2000). Monographs: Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents. Phenolphthalein 76, 387 [dostęp: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/./mono76-15.pdf>].

Konieczko K. (2017). Fenoloftaleina – frakcja wdychalna. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego (praca nieopublikowana).

Khazan M., Hedayati M., Kobarfard F., Askari S., Azizi F. (2014). Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements. Iranian Red Crescent Medical Journal 16(3).

PN-EN 482+A1: 2016-01 Narażenie na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.

PN-Z-04008-7: 2002 Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek powietrza. Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady WE nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji oraz mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie WE nr 1907/2006 z dnia 31.12.2008 r. (Dz. Urz. WE L 353, 1-1355 z późn. zm.)

Rebiere H., Guinot P., Civade C., Bonnet P.A., Nicolas A. (2012). Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-array detection. Food Addit Contam Part. A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess 29(2), 161–71.

Torrado S., Fraile S., Torrado J. J., Selles E. (1995). Comparison of reversed-phase liquid chromatography with colorimetry for analysis of phenolphthalein preparations. J. Pharm. Biomed. Anal. 13, 1167–1172.

Wang J., Huang X., Cao J., Wang G., Zhang Q., Ding L. (2014). Simultaneous determination of 25 illegally added drugs in diet health foods by ultra-high performance liquid chromatography. Se Pu 32(2), 151–6.

Wilson P., Masse C. (2016). Detection of Synthetic Drugs as Adulterants in Natural and Herbal Slimming Products by LC-ESI-MS/MS with Polarity Switching. JAOAC Int. 99(4), 929–40.

de Wolf F.A., de Haas E.J.M., Verweij M. (1981). Screening Method for Establishing Laxative Abuse. Clin. Chem. 27(6), 914–917.

Zeng Y., Xu Y., Kee C.L., Low M.Y., Ge X. (2016). Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. Drug Test Anal. 8(3-4), 351–6.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA FENOLOFTALEINY METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń fenoloftaleiny (nr CAS 77-09-8) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS). Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie fenoloftaleiny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,33 mg/m³.

2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą normy PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004). Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Zasada metody polega na zatrzymaniu obecnej w badanym powietrzu frakcji wdychalnej fenoloftaleiny na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji substancji mieszaniną: metanolu, wody i kwasu octowego, a następnie analizie chromatograficznej tak powstałego roztworu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

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

4.2. Dokładność ważenia

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

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się

substancji chemicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich utylizacją.

5. Odczynniki

5.1. Etanol

Stosować etanol o czystości do HPLC.

5.2. Metanol

Stosować metanol o czystości do HPLC.

5.3. Fenoloftaleina

Stosować fenoloftaleinę według punktu 4.

5.4. Kwas octowy lodowaty

Stosować kwas octowy lodowaty według punktu 4.

5.5. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

6. Roztwory

6.1. Roztwór wzorcowy podstawowy fenoloftaleiny

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć na wadze analitycznej wg punktu 7.10. około 0,5 g wzorca fenoloftaleiny wg punktu 5.3. Wzorzec rozpuścić w etanolu wg punktu 5.1., a po rozpuszczeniu się wzorca kolbę uzupełnić do kreski etanolem. Obliczyć zawartość fenoloftaleiny w jednym mililitrze roztworu. Szczelnie zamknięty roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość przez dziesięć dni.

6.2. Roztwór wzorcowy pośredni fenoloftaleiny

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml wg punktu 7.4. odmierzyć za pomocą pipet wg punktów 7.6. i 7.7. taką ilość roztworu wzorcowego podstawowego fenoloftaleiny wg punktu 6.1., aby otrzymać stężenie 40 mg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski etanolem wg punktu 5.1.

6.3. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 5 ml wg punktu 7.3. odmierzyć za pomocą pipet wg punktów

7.7. i 7.8. odpowiednio: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 i 5 ml roztworu wzorcowego pośredniego wg punktu 6.2. i uzupełnić do kreski etanolem. Stężenia fenoloftaleiny w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 0,8; 2; 4; 8; 20 i 40 mg/ml. Roztwory wzorców roboczych należy przygotować w dniu analizy.

6.4. Mieszanina ekstrakcyjna

Do kolby miarowej o pojemności 500 ml odmierzyc: 245 ml metanolu wg punktu 5.2., 245 ml wody wg punktu 5.5. i 10 ml kwasu octowego wg punktu 5.4. Kolbę zakryć korkiem i wymieszać.

7. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

7.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie analizy przy długości fali analitycznej $\lambda = 230$ nm.

7.2. Filtry z włókna szklanego

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm i średnicy porów 1,6 μm .

7.3. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry strzykawkowe o średnicy 25 mm z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm .

7.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności: 5; 10 i 500 ml.

7.5. Kolumna chromatograficzna

Stosować chromatograficzną kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 150 mm \times 3 mm \times 3 μm .

7.6. Naczynka szklane (wiale)

Stosować naczynka o pojemności 2 i 20 ml.

7.7. Pipety automatyczne nastawne

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

7.8. Pipety szklane

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

7.9. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości około 2 l/min wraz z głowicą do pobierania frakcji wdychalnej.

7.10. Waga analityczna

Stosować wagę analityczną umożliwiającą ważenie z dokładnością do 0,0002 g.

7.11. Wytrząsarka rotacyjna

Stosować wytrząsarkę rotacyjną.

8. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN Z 04008-7:2002. Filtr wg punktu 7.2. umieścić w głowicy do pobierania frakcji wdychalnej. Za pomocą pompy wg punktu 7.9. przepuścić przez filtr z włókna szklanego wg punktu 7.2. maksymalnie 240 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki zachowują trwałość przez co najmniej 30 dni.

9. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby zapewnić selektywne oznaczanie fenoloftaleiny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej o parametrach podanych w punkcie 7.5., oznaczanie można wykonać w warunkach podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako przykładowe.

Tabela 1.

Przykładowe warunki pracy chromatografu cieczowego

Kolumna analityczna Supelcosil™ LC-18 150 mm \times 3 mm, 3 μm		
Faza ruchoma	Metanol + kwas octowy (9:1 v:v)	Woda: kwas octowy (9:1 v:v)
Program – izokratycznie (v:v)	50%	50%
Strumień objętości	0,25 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	230 nm	
Objętość próbki	5 μl	

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na sześć filtrów wg punktu 7.2. nanieść za pomocą pipety automatycznej wg punktu 7.7. po 100 μ l roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 6.3. Jednocześnie przygotować próbkę zerową (przez naniesienie 100 μ l etanolu). Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 20 ml wg punktu 7.6. Do każdego naczynka dodać po 10 ml mieszaniny ekstrakcyjnej wg punktu 6.4. i poddać 60-minutowej ekstrakcji przy użyciu wstrząsarki wg punktu 7.11. Stężenia wzorca fenoloftaleiny w roztworach po ekstrakcji wynoszą odpowiednio: 0; 8; 20; 40; 80; 200 i 400 μ g/ml. Ekstrakty przesączyć przez filtry wg punktu 7.3. do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 7.6. i poddać zawartość analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość wzorca naniesionego na filtr, a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni (wysokości) pików danego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

11. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 20 ml wg punktu 7.6.,

dodać 10 ml mieszaniny ekstrakcyjnej wg punktu 6.4. i poddać 60-minutowej ekstrakcji przy użyciu wstrząsarki wg punktu 7.11. Ekstrakty przesączyć przez filtry wg punktu 7.3. do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 7.6. i poddać analizie chromatograficznej. W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtórne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie należy uwzględnić w obliczeniach.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

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

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

w którym:

- c – zawartość fenoloftaleiny odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.