



# 5-Chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-on i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-on (mieszanina CIT/MIT)

## Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną<sup>1</sup>

### 5-Chloro-2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one and 2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one (CIT/MIT mixture)

#### Determination in workplace air with high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection

MARZENA BONCZAROWSKA

<https://orcid.org/0000-0003-3612-0656>

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

<https://orcid.org/0000-0002-0542-8538>

e-mail: [slawomir.brzeznicki@imp.lodz.pl](mailto:slawomir.brzeznicki@imp.lodz.pl)

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera

Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

Numer CAS 55965-84-9

#### Streszczenie

Masa poreakcyjna 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (3: 1), określana jako CIT/MIT, w temperaturze pokojowej jest jasnożółtym ciałem stałym o strukturze krystalicznej. CIT/MIT bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie (>3 kg/l), natomiast słabiej w takich rozpuszczalnikach organicznych, jak: metanol, octan etylu czy toluen. CIT/MIT jest powszechnie stosowany jako środek biobójczy w produktach konsumenckich. Występuje zarówno w kosmetykach, jak i środkach czyszczących, a także produktach detergentowych (np. w farbách). Szkodliwe działanie mieszaniny CIT/MIT manifestuje się podrażnieniem skóry oraz błon śluzowych oczu. Substancja ta może również działać uczulająco zwłaszcza w stężeniach wyższych niż 0,0015%. Celem prac badawczych było opracowanie i walidacja metody oznaczania mieszaniny CIT/MIT w środowisku pracy. Opracowana metoda oznaczania mieszaniny CIT/MIT polega na pochłanianiu par lub aerozolu na płuczki z wodą destylowaną i oznaczeniu składników mieszaniny techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV-VIS). Opracowana metoda jest liniowa w zakresie stężeń 0,2 ÷ 4 µg/ml, co odpowiada zakresowi 0,02 ÷ 0,4 mg/m<sup>3</sup> dla próbki powietrza o objętości 100 l. Sporządzona metoda analityczna umożliwi oznaczanie mieszaniny CIT/MIT w powietrzu na stanowiskach pracy w obecności innych związ-

<sup>1</sup> Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr II.PB.02 pt. „Opracowanie metod oznaczania 12 szkodliwych substancji chemicznych w powietrzu na stanowiskach pracy do oceny narażenia zawodowego”.

Koordinator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

ków z grupy izotiazolanów. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania normy PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda oznaczania mieszaniny CIT/MIT w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia dotyczące zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy, będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

**Słowa kluczowe:** izotiazolany, CIT/MIT, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

## Abstract

Post reaction mixture of 5-chloro-2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one and 2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one (3: 1) named as CIT/MIT in room temperature is a light yellow crystalline solid. CIT/MIT is highly soluble in water (>3 kg/l) and slightly soluble in such organic solvents, as methanol, ethyl acetate or toluene. CIT/MIT is used as biocide in consumer products like cosmetics, cleaning fluids or paints. CIT/MIT may cause side effects such as skin or eye irritation. It may also cause skin sensitization especially in concentrations higher than 0.0015%. The aim of the work was to develop and validate a method of determination of CIT/MIT in workplace air. The method is based on collection of the vapors or aerosol of these substances in water filled impingers, and analysis of the resulted solution by means of HPLC-UV-VIS technique. The developed method is linear in the concentration range of 0.2–4 µg/ml, which corresponds to the range of 0.02–0.4 mg/m<sup>3</sup> for a 100-L air sample. The analytical method described in this paper enables determination of CIT/MIT mixture in air at workplaces in the presence of other isothiazolones. The method is precise, accurate and it meets the criteria for procedure for determination of chemical agents listed in Standard No. PN-EN 482. Developed method of determination of CIT/MIT at workplaces 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:** isothiazolones CIT/MIT, liquid chromatography method, workplace air, health sciences, environmental engineering.

## WPROWADZENIE

Masa poreakcyjna 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (3: 1), określana jako CIT/MIT, w temperaturze pokojowej jest ciałem stałym o strukturze krystalicznej. CIT/MIT bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie (>3 kg/l), natomiast słabiej w takich rozpuszczalnikach organicznych, jak: metanol, octan etylu czy toluen. CIT/MIT jest otrzymywany w reakcji dityo-*N,N'*-dimetylodipropanoamidu z nadmiarem chlorku siarczynu w 1,2-dichloroetenie jako mieszanina 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT) i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (MIT). Przybliżony stosunek obu związków w mieszaninie poreakcyjnej wynosi 3: 1. Mieszanina CIT/MIT jest stosowana powszechnie jako środek biobójczy. W instalacjach przemysłowych CIT/MIT wykorzystuje się do kontrolowania rozwoju mikroorganizmów (tj. bakterii, grzybów, glonów) w płynach technologicznych (instalacje chłodnicze) oraz w płynach stosowanych do obróbki metali lub drewna. CIT/MIT jest również stosowany jako dodatek konserwujący do: produktów chemii

użytkowej, farb, klejów lub kosmetyków. Narażenie na CIT/MIT w postaci par lub aerozolu może mieć miejsce podczas produkcji tej mieszaniny lub w trakcie stosowania płynów zawierających CIT/MIT do obróbki metali lub drewna (ECHA 2022; Konieczko, Broda 2022).

Szkodliwe działanie mieszaniny CIT/MIT manifestuje się podrażnieniem skóry oraz błon śluzowych oczu. Substancja ta może również działać uczulająco, zwłaszcza w stężeniach wyższych niż 0,0015% (Konieczko, Broda 2022; PubChem 2022).

W tabeli 1 przedstawiono zharmonizowaną klasyfikację i oznakowanie mieszaniny CIT/MIT zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady WE nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 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 ze zm. (rozporządzeniem Komisji (WE) nr 790/2009), (Rozporządzenie... 2008).

**Tabela 1.** Zharmonizowana klasyfikacja oraz oznakowanie mieszaniny poreakcyjnej CIT/MIT zgodnie z obowiązującymi aktami prawnymi (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008)

**Table 1.** Classification and labeling of CIT/MIT post reaction mixture in accordance with the applicable legal acts (Regulation (EC) No 1272/2008)

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Acute Tox. 2 toksyczność ostra – kategoria 2	H330 wdychanie grozi śmiercią
Acute Tox. 2 toksyczność ostra – kategoria 2	H310 grozi śmiercią w kontakcie ze skórą
Acute Tox. 3 toksyczność ostra – kategoria 2	H301 działa toksycznie po połknięciu
Skin Corr. 1C działanie żrące/drażniące na skórę – kategoria 1	H314 powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu
Eye Dam. 1 poważne uszkodzenie oczu/działanie drażniące na oczy – kategoria 1	H318 powoduje poważne uszkodzenia oczu
Skin Sens. 1A działanie uczulające na drogi oddechowe lub skórę – kategoria 1A (skóra)	H317 może powodować reakcje alergiczną skóry
Aquatic Acute 1 stwarzająca zagrożenie dla środowiska wodnego – kategoria ostra	H400 działa toksycznie na organizmy wodne
Aquatic Chronic 1 stwarzająca zagrożenie dla środowiska wodnego – kategoria przewlekła	H410 działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki

Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN Czynniki Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla mieszaniny poreakcyjnej CIT/MIT w powietrzu środowiska pracy na poziomie 0,2 mg/m<sup>3</sup> oraz wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) na poziomie 0,4 mg/m<sup>3</sup>. Dodatkowo zaproponowano oznakowanie związku symbolami: „skóra” – wchłanianie substancji przez skórę może być tak samo istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową, „A” – substancja o działaniu uczulającym oraz „C” – substancja o działaniu żrącym (Koniczek, Broda 2022).

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czulej i selektywnej metody oznaczania mieszaniny CIT/MIT w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiar jej stężeń zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego.

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

## Założenia opracowanej metody

Ze względu na właściwości fizykochemiczne obu składników mieszaniny (5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu) oraz możliwość występowania mieszaniny CIT/MIT w środowisku pracy w postaci aerozolu lub par zdecydowano o zastosowaniu do pobierania próbek powietrza płuczek bełkotkowych wypełnionych wodą. Taki sposób pobierania próbek powietrza do oznaczeń mieszaniny CIT/MIT został opisany w pracy badaczy koreańskich (Park i in. 2020) i był uzasadniony przez autorów wysoką reaktywnością i nietrwałością izotiazolanów w powietrzu. Do oznaczeń ilościowych izotiazolanów w produktach chemii przemysłowej, wyrobach kosmetycznych, powietrzu lub wodzie najczęściej wykorzystuje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (Baranowska, Wojciechowska 2013; Cha i in. 2012; Nagorka i in. 2015; Park i in. 2020; Rosero-Moreano i in. 2014) lub w sprzężeniu z tandemową spektrometrią mas (Kawakami i in. 2012; Lin i in. 2010; Speksnijder i in. 2010; Zhong i in. 2019). Znacznie rzadziej jest wykorzystywana do tego celu technika chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją mas (García i in. 2020; Rafoth i in. 2007).

Na podstawie dostępnych danych z piśmiennictwa stwierdzono, że oba związki tworzące mieszaninę CIT/MIT można oznaczyć techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosując kolumny wypełnione fazą oktadecylową C-18 (Baranowska, Wojciechowska 2013; Cha i in. 2012; Nagorka i in. 2015; Park i in. 2020; Rosero-Moreano i in. 2014).

Na podstawie danych literaturowych, własności fizykochemicznych CIT/MIT, a także proponowanych wartości NDS i NDSCh założono pobieranie próbek powietrza do płuczek bełkotkowych wypełnionych wodą i analizę instrumentalną techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do pobierania próbek powietrza zastosowano płuczki bełkotkowe o pojemności 25 ml wypełnione 10 ml wody destylowanej. Do oznaczeń ilościowych wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Przy opracowaniu metody oznaczania mieszaniny CIT/MIT w powietrzu przyjęto następujące założenia:

- pobór jednej próbki na zmianę roboczą
- objętość pobranego powietrza 100 l
- zakres pomiarowy  $0,2 \div 4,0 \mu\text{g/ml}$  (co dla próbki powietrza 100 l odpowiada zakresowi  $0,02 \div 0,4 \text{ mg/m}^3$  ( $1/10 \div 2$  NDS)).

### Aparatura, materiały i odczynniki

Wszystkie badania wykonano z zastosowaniem aparatury analitycznej, materiałów i odczynników wymienionych poniżej.

#### Aparatura:

- aspiratory indywidualne SKC Model 222
- chromatograf cieczowy Acquity Arc LC System firmy Waters wyposażony w poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, detektor spektrofotometryczny Waters 2489, termostat kolumny analitycznej, automatyczny dozownik

próbek i komputer z programem sterowania i akwizycji danych

- kolumna Waters CORTECS C18 o długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm wypełnionej złożem o średnicy ziaren  $2,7 \mu\text{m}$ .

#### Materiały:

- płuczki bełkotkowe o pojemności 25 ml ze spiekami szklanymi
- filtry strzykawkowe z membraną z PTFE (Supelco)
- kolby miarowe o pojemności 10 ml
- naczynka (wialki) szklane o pojemności 2 ml ze szkła oranżowego
- pipety automatyczne nastawne o pojemności:  $0,010 \div 0,1 \text{ ml}$ ;  $0,1 \div 1 \text{ ml}$  i  $0,5 \div 5 \text{ ml}$ .

#### Odczynniki:

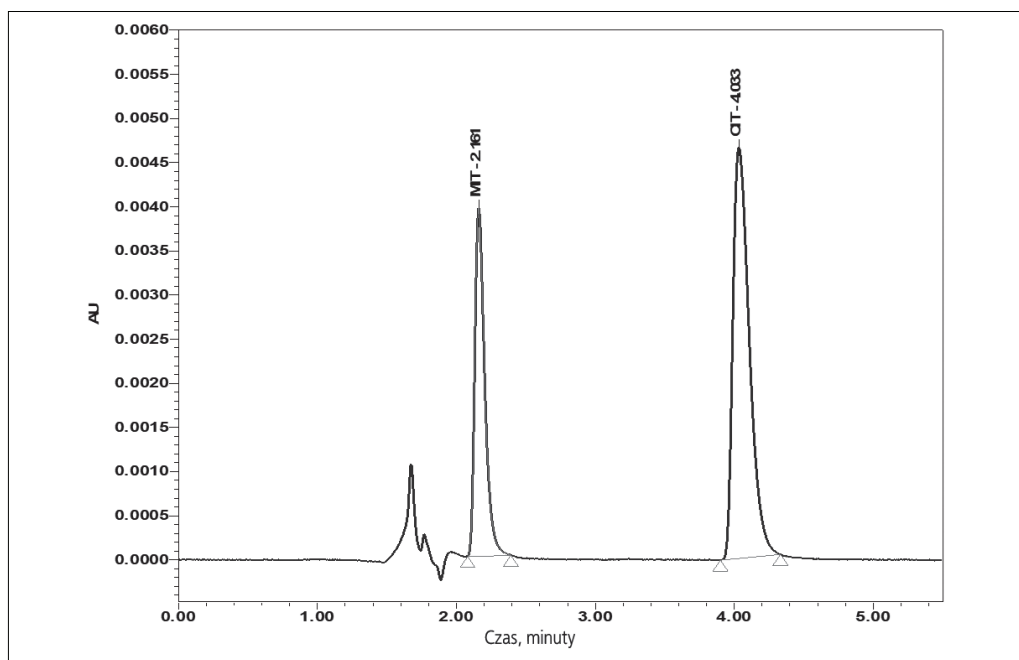
- mieszanina CIT/MIT (certyfikowany materiał odniesienia (CRM) stanowiący mieszaninę 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT) i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (MIT) zmieszanych w stosunku 3: 1), (Merck)
- metanol do HPLC (JT Baker)
- woda o czystości do HPLC.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

### Dobór optymalnych warunków rozdziału chromatograficznego

Masa poreakcyjna CIT/MIT jest mieszaniną złożoną z dwóch składników: 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT) i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu

(MIT). Zaproponowana wartość NDS dotyczy sumy stężeń obu składników, co wymaga dobrania warunków rozdziału chromatograficznego (rodzaj kolumny analitycznej, modyfikacja składu fazy ruchomej) umożliwiających selektywne



**Rycina 1.** Chromatogram mieszanki 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (MIT) i 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (CIT). Kolumna CORTECS (150 mm × 3 mm),  $\lambda = 274$  nm

**Figure 1.** Chromatogram of a mixture of 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT) and 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one (CIT). CORTECS column (150 mm × 3 mm),  $\lambda = 274$  nm

oznaczenie obu komponentów. Możliwość selektywnego oznaczania mieszanki CIT/MIT testowano na kolumnie Waters CORTECS (150 mm × 3 mm) eluowanej mieszaniną metanolu i wody o stałym składzie procentowym (30: 70 – elucja izokratyczna). Parametry pracy detektora UV-VIS (długość fali analitycznej  $\lambda = 274$ ) dobrano na podstawie danych literaturowych (Baranowska, Wojciechowska 2020).

Na rycinie 1 przedstawiono chromatogram mieszanki CIT/MIT analizowanej przy zastosowaniu kolumny CORTECS C-18.

Wszystkie parametry analizy instrumentalnej podano w tabeli 2. Podane warunki pracy chro-

matografu cieczowego umożliwiają selektywne oznaczenie stężenia każdego ze składników mieszanki. Ewentualna obecność substancji współwystępujących (inne substancje z grupy izotiazolonów, takie jak: 1,2-benzotiazol-3(2H)-on, 2-oktyl-3(2H)-izotiazolinon, dichlorooktylizotiazolinon lub 2-metyl-1,2-benzoizotiazolin-3-on) przy założonych parametrach analizy nie będzie przeszkadzała w selektywnym oznaczeniu CIT i MIT z uwagi na dłuższe czasy retencji wyżej wymienionych substancji (Zhong i in. 2019).

**Tabela 2.** Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS

**Table 2.** Working conditions of a liquid chromatograph with a UV-VIS detector

Kolumna analityczna Waters CORTECS 150 mm × 3 mm, 2,7 $\mu$ m		
Faza ruchoma	woda	metanol
Program – izokratycznie (v:v)	70	30
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,3 ml/min	
Temperatura kolumny	30°C	
Długość fali analitycznej, $\lambda$	274 nm	
Objętość dozowanej próbki	5 $\mu$ l	

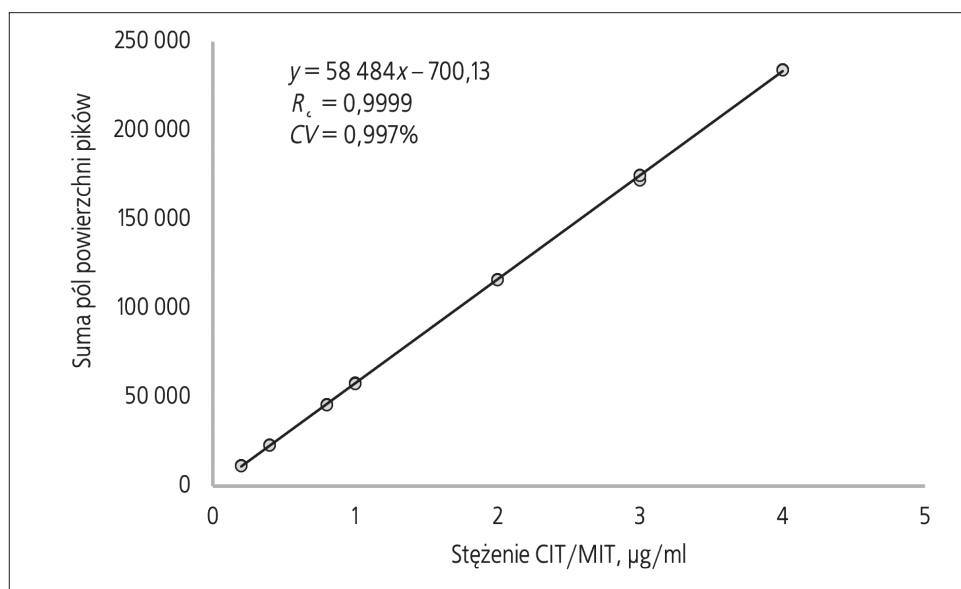
## Badanie zakresu stosowania liniowości i precyzji metody analitycznej

W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT/MIT) przygotowano 3 serie po 8 kolb miarowych o pojemności 10 ml. Z certyfikowanego materiału odniesienia (CRM) mieszaniny CIT/MIT sporządzono roztwór o sumarycznym stężeniu obu składników wynoszącym 40 µg/ml. Do kolb miarowych o pojemności 10 ml dodano po: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 ml roztworu mieszaniny CIT/MIT i uzupełniono kolby do kreski wodą. Sumaryczne stężenia obu związków w tak przygotowanych roztworach wynosiły: 0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 3 i 4 µg/ml (CIT – 0,15; 0,3; 0,6; 0,75; 1,5; 2,25

i 3 µg/ml oraz MIT – 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 µg/ml). Po dokładnym wymieszaniu roztwory przeniesiono do naczynek chromatograficznych o pojemności 2 ml i poddano analizie chromatograficznej przy długości fali 274 nm.

Wyniki badania liniowości metody w badanym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 3 i graficznie na rycinie 2. Z uzyskanych danych wynika, że zależność odpowiedzi detektora spektrofotometrycznego na analizowane stężenia CIT/MIT w badanym zakresie stężeń 0,2 ÷ 4 µg/ml ma charakter liniowy. Zależność tę opisuje równanie:  $y = 58\,484x - 700,13$ . Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) dla 3 serii kalibracyjnych wynosi 1,0%, a współczynnik regresji  $r = 0,9999$ .

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano



**Rycina 2.** Krzywa wzorcowa mieszaniny CIT/MIT w zakresie 0,2 ÷ 4,0 µg/ml

**Figure 2.** Standard curve of CIT/MIT mixture in the range of 0.2–4.0 µg/ml

**Tabela 3.** Wyniki wzorcowania mieszaniny CIT/MIT w roztworach kalibracyjnych

**Table 3.** Calibration results of CIT/MIT mixture in standard solutions

Badane parametry	Stężenie CIT/MIT, µg/ml						
	0,2	0,4	0,8	1,0	2,0	3,0	4,0
Suma pól powierzchni pików (PPP)	11 632	23 139	45 862	57 945	116 249	172 098	234 120
Średnia PPP	11 608	22 922	45 748	57 704	116 123	174 820	234 197
Odchylenie standardowe, SD	11 334	22 730	45 438	57 542	115 714	174 579	233 961
Współczynnik zmienności, CV, %	11 524,7	22 930,3	45 682,7	57 730,3	116 028,7	173 832,3	234 092,7
	165,6	204,6	219,4	202,8	279,7	1506,8	120,4
	1,4	0,9	0,5	0,4	0,2	0,9	0,1

3 serie po 10 roztworów wzorcowych CIT/MIT o sumarycznych stężeniach: 0,2; 1 i 4 µg/ml. Roztwory poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki badań precyzji oznaczeń przedstawiono w tabeli 4. Wskazują one na to, iż założone warunki wykonania analizy pozwalają na precyzyjne wykonanie oznaczeń stężeń CIT/MIT w powietrzu. Współczynniki zmienności (CV) rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 0,2; 1 i 4 µg/ml wynoszą odpowiednio: 0,61; 0,59 i 0,27%, a rozrzut wyników oznaczeń CIT/MIT w roztworach w stosunku do wartości zakładanej nie przekracza 1,4% dla żadnego z analizowanych stężeń.

### Badanie warunków pobierania próbek powietrza

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na możliwość powstawania strat analizowanych związków mieszaniny 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 5-chloro-2-metylo-2H-

-izotiazol-3-onu (CIT/MIT) przygotowano 3 serie po 6 par połączonych szeregowo płuczek bełkotkowych. Płuczki A zawierały po 10 ml roztworu mieszaniny CIT/MIT o sumarycznym stężeniu: 2; 10 i 40 µg/10 ml (0,2; 1 i 4 µg/ml), płuczki B zawierały 10 ml czystej wody bez dodatku wzorca. Przez płuczki przepuszczono ok. 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 265 ml/min za pomocą niskoprzepływowych aspiratorów indywidualnych. Roztwory z obu płuczek poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach.

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza przedstawiono w tabeli 5. Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analitu. Wyrażone w procentach średnie wartości współczynnika odzysku CIT/MIT z roztworu adsorpcyjnego (10 ml), przez który przepuszczono 100 l powietrza, dla 3 analizowanych zawartości CIT/MIT w płuczce (2, 10 i 40 µg) wynoszą odpowiednio:

**Tabela 4.** Badanie precyzji metody oznaczania mieszaniny CIT/MIT  
**Table 4.** Precision testing for determining CIT/MIT mixture

Numer analizy	Stężenie CIT/MIT, µg/ml					
	zakładane		oznaczone		zakładane	
1	0,2		0,198	1,0	4,0	4,072
2			0,197			4,049
3			0,195			4,063
4			0,196			4,046
4			0,195			4,043
6			0,196			4,040
7			0,195			4,051
8			0,195			4,048
9			0,196			4,060
10			0,198			4,038
Średnia			0,196			4,051
Odchylenie standardowe, SD			0,001			0,011
Współczynnik zmienności, CV, %			0,61			0,27

**Tabela 5.** Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń mieszaniny CIT/MIT  
**Table 5.** Examination of the air sampling conditions for the determination of CIT/MIT mixture

Medium pochłaniające	Stężenie CIT/MIT, µg/ml	Pole powierzchni piku		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	roztwór po desorpcji		
Woda	0,2		10 847	95,8	95,8
			10 986	97,0	
			10 850	95,8	
			10 786	95,3	
			11 026	97,4	
			11 222	93,5	
			11 269	10 586	
			SD	1,39	
			CV	1,45%	

cd. tab. 5 / Table 5 cont.

Medium pochłaniające	Stężenie CIT/MIT, $\mu\text{g/ml}$	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	roztwór po desorpcji		
Woda	1,0	57 795 58 310 58 057	54 702 54 644 55 505 56 102 55 905 55 587	94,2 94,1 95,6 96,6 96,3 95,8  SD 1,05 CV 1,10%	95,4
	4,0	234 740 231 514 235 078	228 696 230 497 227 301 229 801 226 345 229 212	97,8 98,6 97,2 98,3 96,8 98,0  SD 0,73 CV 0,75 %	97,8
Średni współczynnik odzysku, $\bar{x}$ , %				96,4	
Odchylenie standardowe, $SD$				1,5	
Współczynnik zmienności, $CV$ , %				1,5	

95,8% ( $SD - 1,39$ ); 95,4% ( $SD - 1,05$ ) i 97,8% ( $SD - 0,76$ ). Średnia wartość odzysku dla 3 stężeń wynosi 96,4% ( $SD - 1,5$ ). W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności CIT/MIT w roztworach z drugiej płuczki.

### Badanie trwałości próbek CIT/MIT pobranych do płuczek

W celu zbadania trwałości pobranych do płuczek próbek powietrza zawierającego mieszaninę 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT/MIT) przygotowano 3 serie po 24 naczynka szklane, w których umieszczono po 10 ml roztworów CIT/MIT o sumarycznym stężeniu: 0,2; 1 i 4  $\mu\text{g/ml}$ . Roztwory umieszczono w chłodziarce. Po 5, 12, 19 i 35 dniach przechowywania poddawano je analizie po 6 roztworów z każdego stężenia. Wartości sumy pól powierzchni pików badanych związków uzyskane z analiz roztworów wzorcowych porównano z wynikami analiz roztworów wzorcowych CIT/MIT o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania pobranych próbek CIT/MIT przedstawiono w tabeli 6. Z zamieszczonych w tabeli danych wynika, że próbki mieszaniny CIT/MIT pobrane na płuczki z wodą i przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 35 dni. Wyrażone w procentach średnie wartości współczynnika odzysku dla

poszczególnych stężeń CIT/MIT w roztworze (2, 10 i 40  $\mu\text{g/10 ml}$ ) po 35 dniach przechowywania wynoszą odpowiednio: 99,1% ( $SD - 0,53$ ); 100,7% ( $SD - 0,13$ ) i 98,8% ( $SD - 0,78$ ). Średnia wartość wydajności desorpcji dla 3 stężeń wynosi 99,5% ( $SD - 1,0$ ).

### Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności metody

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności mieszaniny 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT/MIT) przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (2000).

Z wzorca mieszaniny CIT/MIT o sumarycznym stężeniu 0,2  $\mu\text{g/ml}$  przygotowano 20 roztworów o stężeniu 0,004  $\mu\text{g/ml}$  (wzorzec o najniższym stężeniu rozcieńczono 50 razy), które poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach.

Wyniki analiz dotyczących wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności mieszaniny CIT/MIT z zastosowaniem techniki HPLC UV-VIS przedstawiono w tabeli 7. Obliczone granice wykrywalności i oznaczalności z uwzględnieniem wartości średniej oraz odchylenia standardowego sumy sygnałów tła o czasie retencji CIT i MIT z uwzględnieniem współczynnika nachylenia krzywej wzorcowej wynoszą odpowiednio 0,0004 i 0,001  $\mu\text{g/ml}$ .



**Tabela 6.** Trwałość próbek mieszaniny CIT/MIT w zależności od czasu przechowywania

**Table 6.** Stability of CIT/MIT mixture samples depending on storage time

Czas, liczba dni	Stężenie CIT/MIT (suma) w roztworze, µg/ml								
	0,2			1,0			4,0		
5	98,3%	100,3%	99,3%	99,3%	99,5%	100,9%	98,9%	97,5%	98,8%
	99,8%	99,8%	97,5%	99,0%	99,6%	101,9%	98,9%	97,4%	98,9%
	Śr	99,2%		Śr	100,0%		Śr	98,4%	
	SD	1,08		SD	1,10		SD	0,76	
	CV	1,09%		CV	1,10%		CV	0,77%	
	Średni współczynnik wydajności desorpcji, Śr			98,4%					
	Odchylenie standardowe, SD			1,2					
	Współczynnik zmienności, CV			1,2%					
12	99,3%	99,0%	99,1%	99,6%	100,0%	100,1%	98,9%	97,7%	99,6%
	98,7%	98,3%	99,5%	99,7%	100,5%	99,7%	99,0%	97,8%	99,5%
	Śr	99,0%		Śr	99,9%		Śr	98,7%	
	SD	0,43		SD	0,34		SD	0,82	
	CV	0,43%		CV	0,34%		CV	0,83%	
	Średni współczynnik wydajności desorpcji, Śr			99,2%					
	Odchylenie standardowe, SD			0,8					
	Współczynnik zmienności, CV			0,8%					
19	100,2%	100,0%	100,1%	99,7%	100,0%	99,8%	99,5%	98,0%	99,5%
	100,8%	100,0%	99,4%	99,8%	100,1%	99,6%	99,1%	97,8%	99,5%
	Śr	100,1%		Śr	99,9%		Śr	98,9%	
	SD	0,46		SD	0,18		SD	0,80	
	CV	0,46%		CV	0,18%		CV	0,81%	
	Średni współczynnik wydajności desorpcji, Śr			99,6%					
	Odchylenie standardowe, SD			0,7					
	Współczynnik zmienności, CV			0,7%					
35	99,3%	98,2%	99,3%	100,5%	100,8%	100,6%	99,4%	97,9%	98,2%
	99,7%	99,4%	98,8%	100,6%	100,8%	100,7%	99,5%	98,2%	99,7%
	Śr	99,1%		Śr	100,7%		Śr	98,8%	
	SD	0,53		SD	0,13		SD	0,78	
	CV	0,53%		CV	0,13%		CV	0,79%	
	Średni współczynnik wydajności desorpcji, Śr			99,5%					
	Odchylenie standardowe, SD			1,0					
	Współczynnik zmienności, CV			1,0%					

**Tabela 7.** Wyznaczanie granic wykrywalności (GW) i oznaczalności (GO) mieszaniny CIT/MIT

**Table 7.** Determination of determination (LOD) and quantification limits (LOQ) CIT/MIT mixtures

Wyznaczone parametry	Wartości sygnału (suma pól powierzchni pików o czasie retencji CIT i MIT)	
		161 154 172 169 162 160 154 164 145 162
Średnie pole powierzchni, $n = 20$	163,90	
Odchylenie standardowe, $S$	7,85	
Współczynnik zmienności, $CV, \%$	4,79	
Granica wykrywalności, $GW, \mu\text{g/ml}$	0,0004	
Granica oznaczalności, $GO, \mu\text{g/ml}$	0,001	

**Walidacja metody**

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne dla metody HPLC-UV-VIS:

- zakres pomiarowy metody  $0,2 \div 4,0 \mu\text{g/ml}$   
 $(0,02 \div 0,4 \text{ mg/m}^3)$

dla próbek powietrza 100 l)

- granica wykrywalności  $0,0004 \mu\text{g/ml}$
- granica oznaczalności  $0,001 \mu\text{g/ml}$
- współczynnik korelacji  $r = 0,9992$
- niepewność rozszerzona metody  $14,9\%$ .

**PODSUMOWANIE**

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania mieszaniny 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu i 5-chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-onu (CIT/MIT) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Wskazania detektora UV-VIS w funkcji stężenia sumy badanych związków w badanym zakresie stężeń ( $0,2 \div 4 \mu\text{g/ml}$ ) mają charakter liniowy. Do zatrzymania pyłów lub aerozolu mieszaniny CIT/MIT z powietrza należy stosować płuczki bełkotkowe, a jako roztwór pochłaniający – wodę destylowaną. Wyrażony w procentach współczynnik odzysku dla mieszaniny CIT/MIT wynosi 96,4%. Próbkę CIT/MIT w roztwo-

rach wodnych przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez min. 35 dni. Opracowana metoda umożliwia oznaczanie mieszaniny CIT/MIT w powietrzu na stanowiskach pracy w stężeniach od  $0,2 \text{ mg/m}^3$ , czyli od 1/10 proponowanej wartości NDS. Przedstawiona metoda umożliwia oznaczanie CIT i MIT w obecności innych związków z grupy izotiazolanów mogących występować w badanym powietrzu. Opracowaną metodę oznaczania mieszaniny CIT/MIT w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

**PIŚMIENNICTWO**

Baranowska I., Wojciechowska I. (2013). The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 1609–1625.

Cha N.R., Lee J.K., Jeong H.J. i in. (2012). Determination of 19 preservatives in various matrices by high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 45, 2148–2160.

Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 3(25), 5–14.

ECHA, European Chemicals Agency (2022). Substance information: Reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one, <https://echa.europa.eu/pl/substance-information/-/substanceinfo/100.136.387> [dostęp: 2022].

García E., Giráldez I., Montoya M.R. i in. (2020). Determination of booster biocides in sediments by focused ultrasound-assisted extraction and stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.* 152, 104445.

Kawakami T., Isama K., Nishimura T. (2012). Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan. *J. Environ. Chem.* 22, 205–211.

Konieczko K., Broda A. (2022). 5-Chloro-2-metylo-2*H*-izotiazol-3-on i 2-metylo-2*H*-izotiazol-3-on (masa poreakcyjna 3:1). Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(111), 53–79

Lin Q.B., Wang T.J., Song H. i in. (2010). Analysis of isothiazolinone biocides in paper for food packaging by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* 27, 1775–1781.

Nagorka R., Gleue C., Scheller C. i in. (2015). Isothiazolone emissions from building products. *Indoor Air* 25(1), 68–78.

Park S.K., Seol H.S., Park H.J. i in. (2020). Experimental determination of indoor air concentration of 5-chloro-2-methylisothiazol-3(2*H*)-one/2-methylisothiazol-3(2*H*)-one (CMIT/MIT) emitted by the use of humidifier disinfectant. *Environ. Anal. Health Toxicol.* 35(2), 1–6.

PN-EN 482: 2021-08 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężenia czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur.

PubChem (2022). National Library of Medicine. Compound summary KATHON 886, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41679> [dostęp: 2022].

Rafoth A., Gabriel S., Sacher F. i in. (2007). Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1164, 74–81.

Rosero-Moreano M., Canellas E., Nerín C. (2014). Three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with HPLC-UV for the determination of isothiazolinones biocides in adhesives used for food packaging materials. *J. Sep. Sci.* 37, 272–280.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE

oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. z dnia 31.12.2008 r. (WE L 353/2) ze zm. [Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006].

Speksnijder P., Ravestijin J.V., Voogt P. (2010). Trace analysis of isothiazolinones in water samples by large-volume direct injection liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 5184–5189.

Zhong H., Li Z., Chen S. i in. (2019). Simultaneous quantitative analysis of six isothiazolinones in water-based adhesive used for food contact materials by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Molecules* 24(21), 3894.



PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA MIESZANINY  
5-CHLORO-2-METYLO-2H-IZOTIAZOL-3-ONU  
I 2-METYLO-2H-IZOTIAZOL-3-ONU (CIT/MIT)  
W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY  
Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

### 1. Zakres stosowania metody

W niniejszej procedurze analitycznej podano metodę oznaczania zawartości CIT/MIT (masa poreakcyjna 3: 1), (numer CAS: 55965-84-9) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS). Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarno-higienicznych. Najmniejsze stężenie CIT/MIT, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi  $0,02 \text{ mg/m}^3$  (dla próbki powietrza o objętości 100 l).

### 2. Powołania normatywne

Do stosowania niniejszego dokumentu są niezbędne podane niżej dokumenty, które w całości lub w części zostały w nim normatywnie powołane. W przypadku powołań datowanych ma zastosowanie wyłącznie wydanie cytowane. W przypadku powołań niedatowanych stosuje się ostatnie wydanie dokumentu powołanego (łącznie ze zmianami).

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 przez płuczkę belkotkową zawierającą 10 ml wody, obecnej w badanym powietrzu mieszaniny CIT/MIT oraz przeprowadzeniu analizy chromatograficznej.

### 4. Postanowienia ogólne

#### 4.1. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

Czynności, podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać z użyciem środków ochrony indywidualnej pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Pozostałe po analizie roztwory odczynników i wzorców należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji w uprawnionych instytucjach.

### 5. Odczynniki, roztwory i materiały

Podczas analizy, jeśli nie ma innych wymagań, należy stosować substancje o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

#### 5.1. Roztwór CIT/MIT (masa poreakcyjna CIT/MIT 3: 1)

Stosować Certyfikowany Materiał Odniesienia (CRM).

#### 5.2. Metanol

Stosować metanol o czystości do HPLC.

#### 5.3. Woda destylowana

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

5.4. Roztwór wzorcowy podstawowy CIT/MIT  
Do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml wg punktu 6.5 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.4 taką objętość Certyfikowanego Materiału Odniesienia (CRM) wg punktu 5.1, aby końcowe stężenie sumy składników mieszaniny CIT/MIT po uzupełnieniu kolby do kreski wodą wg punktu 5.3 wyniosło  $40 \mu\text{g/ml}$ .

### 5.5. Roztwory wzorcowe robocze CIT/MIT

Do ośmiu kolb pomiarowych wg punktu 6.5 o pojemności 10 ml odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.4 odpowiednio: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 ml wzorca podstawowego wg punktu 5.4. Kolby uzupełnić do kreski wodą wg punktu 5.3. Stężenia CIT/MIT w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 3 i 4 µg/ml, co odpowiada stężeniom: CIT – 0,15; 0,3; 0,6; 0,75; 1,5; 2,25 i 3 µg/ml oraz MIT – 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 µg/ml. Roztwory wg punktów 5.4 i 5.5 przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej 35 dni.

## 6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

### 6.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym.

### 6.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca selektywne oznaczanie CIT/MIT: kolumna CORTECS wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową o uziarnieniu 2,7 µm, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm.

### 6.3. Pompa ssąca

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

### 6.4. Pipety do cieczy

Pipety automatyczne nastawne o pojemności: 0,010 ÷ 0,1 ml; 0,1 ÷ 1 ml i 0,5 ÷ 5 ml.

### 6.5. Kolby pomiarowe

Kolby o pojemności 10 ml.

### 6.6. Naczynka szklane

Naczynka szklane o pojemności 2 ml.

### 6.7. Płuczki bełkotkowe

Płuczki bełkotkowe o pojemności 25 ml.

### 6.8. Filtry strzykawkowe

Filtry z poli(tetrafluoroetylenu) (PTFE) o średnicy 13 mm i wielkości porów 0,45 µm.

## 7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PNZ04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004). Za pomocą zestawu do pobierania próbek powietrza składającego się z pompy ssącej wg punktu 6.3 oraz szeregowo połączonych 2 płuczek

bełkotkowych o pojemności 25 ml wg punktu 6.7 przepuścić nie mniej niż 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 265 ml/min. W przypadku pobierania próbek chwilowych strumień objętości powietrza można zwiększyć do 1 l/min.

Podczas pobierania próbek powietrza do oznaczeń należy chronić płuczki przed dostępem światła. Roztwory z płuczek przenieść do naczynek ze szkła oranżowego i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce.

Tak przechowywane próbki zachowują trwałość co najmniej 35 dni.

## 8. Warunki pracy chromatografu

W przypadku stosowania kolumny wg punktu 6.2 zastosowano przykładowe warunki wykonania oznaczania:

- |  |               |
|--|---------------|
| - faza ruchoma                                 | woda: metanol |
| - izokratycznie                                | 70: 30 (V: V) |
| - temperatura kolumny                          | 30°C          |
| - natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej | 0,3 ml/min    |
| - długość fali analitycznej detektora UV-VIS   | 274 nm        |
| - objętość dozowanej próbki                    | 5 µl.         |

## 9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

W celu sporządzenia krzywej wzorcowej roztworu robocze wg punktu 5.5 należy poddać analizie chromatograficznej w warunkach podanych w rozdziale 8. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych sumaryczną masę CIT i MIT, a na osi rzędnych – wartość sumy pól powierzchni pików badanych składników mieszaniny CIT/MIT.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

## 10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbek powietrza 1 ml roztworu z każdej płuczki przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.8 do naczynek chromatograficznych wg punktu 6.6. Naczynka szczelnie zamknąć. Próbki poddać analizie chromatograficznej. Zawartość oznaczanej substancji w roztworze z drugiej płuczki nie powinna przekraczać 10% zawartości

oznaczonej w roztworze z płuczki pierwszej. W przeciwnym wypadku wynik należy traktować jako orientacyjny.

### 11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie CIT/MIT ( $X$ ) w badanym powietrzu obliczyć w mikrogramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

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

w którym:

- $m_1$  – masa CIT/MIT w pierwszej płuczce odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,
- $m_2$  – masa CIT/MIT w drugiej płuczce odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,
- $V$  – objętość powietrza przepuszczonego przez płuczki, w metrach sześciennych.

**Adres do korespondencji/Contact details:**

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  
POLAND

