



# Kwas nitrylotriooctowy i jego sole

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

### Nitrioltriacetic acid and its salts

### Determination in workplace air with high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection<sup>1</sup>

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

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

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

MARZENA BONCZAROWSKA

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

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

Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

**Numer CAS** 139-13-9

#### Streszczenie

Kwas nitrylotriooctowy (NTA), podobnie jak jego mono-, di- oraz trisodowe sole, w temperaturze pokojowej stanowi bezwonne, białe, krystaliczne ciało stałe. NTA w przeciwieństwie do swoich soli sodowych bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie i jest nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych. Stosuje się go jako środek zapobiegający osadzaniu kamienia kotłowego, jako środek kompleksujący jony metali podczas barwienia tkanin lub jako środek zapobiegający rozkładowi nadtlenków i wodorosiarczków w przemyśle papierniczym, jak również jako składnik detergentów i płynów czyszczących. NTA i jego sole sodowe zostały uznane za substancje potencjalnie rakotwórcze. Celem badań było opracowanie i walidacja metody oznaczania NTA i jego soli w środowisku pracy. Opracowana metoda oznaczania NTA i jego soli polega na zatrzymaniu pyłów lub aerozolu na filtrach z włókna szklanego, ekstrakcji badanych związków roztworem NaOH o stężeniu 0,2 mol/l i oznaczeniu NTA techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV-VIS). Ta metoda jest liniowa w zakresie stężeń 0,0135 ÷ 0,54 µg/ml, co odpowiada zakresowi 0,15 ÷ 6,0 mg/m<sup>3</sup> dla próbki powietrza o objętości 180 l. Opracowana metoda analityczna umożliwia oznaczanie NTA i jego soli w powietrzu na stanowiskach pracy w obecności innych związków chelatujących, charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością oraz spełnia wymagania normy PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Metoda została zapisana w postaci procedury

<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”. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

This paper is published and based on the results of a research task carried out within the scope of the fifth stage of the National Programme “Improvement of Safety and Working Conditions” supported from the resources of the National Centre for Research and Development. Task no. II.PB.02 entitled “Development of methods for the determination of 12 harmful chemical substances in the air at workplaces for occupational exposure assessment”. The Central Institute for Labour Protection – National Research Institute is the Programme’s main co-ordinator.

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:** kwas nitrylotrioctowy, metoda analityczna, powietrze na stanowiskach pracy, metoda chromatografii cieczowej, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

## Abstract

Nitrilotriacetic acid and its mono-, di- and trisodium salts at room temperature, are white crystalline odorless solids. NTA is poorly (in opposite to its sodium salts) soluble in water. It is soluble with ethanol, however insoluble in most of organic solvents. NTA is used as an anti-limescale agent, as a chelating agent in fabric dyeing and agent preventing of decomposition of peroxides and hydrosulphides in paper processing. It is also used as a component of some detergents and cleaning fluids. NTA and its sodium salts are suspected to be carcinogenic to humans. The aim of the work was to develop and validate method of determination of NTA and its salts in workplace air. The developed method is based on an arrest of dusts or aerosols of these substances on glass fiber filters, extraction of the filters with a 0.2 M NaOH and analysis of the resulted solution by means of HPLC-UV-VIS technique. The developed method is linear in the concentration range of 0.0135–0.54 µg/ml, which corresponds to the range of 0.15–6.0 mg/m<sup>3</sup> for a 180-L air sample. The analytical method described in this paper enables determination of NTA and its salts in air at workplaces in the presence of other chelating agents. 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 NTA 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:** nitrilotriacetic acid, analytical method, air at workplaces, liquid chromatography method, health sciences, environmental engineering.

## WPROWADZENIE

Kwas nitrylotrioctowy (NTA), podobnie jak jego mono-, di- oraz trisodowe sole, to w temperaturze pokojowej białe, krystaliczne ciało stałe. NTA w przeciwieństwie do jego soli sodowych bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie i jest nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych. Rozpuszcza się w etanolu oraz słabo w sulfotlenku dimetylu.

Sole sodowe NTA takie jak: sól disodowa NTA, sól trisodowa NTA oraz sól trisodowa jednowodna są dostępne w handlu, natomiast pozostałe sole (sól sodowa NTA, sól monosodowa NTA, sól disodowa jednowodna) są niedostępne w sprzedaży komercyjnej.

NTA jest otrzymywany np. w reakcji formaldehydu z amoniakiem, której produkt (heksametylenotetraamina) poddawany jest w środowisku kwasu siarkowego reakcji z cyjanowodorem. Powstała triscyjanometyloamina poddawana jest reakcji zmydlania z NaOH, której końcowym produktem jest sól trisodowa NTA, a wodny roztwór substratu po zakwaszeniu (pH 1 – 2) pozwala na otrzymanie czystego NTA (PubChem 2022).

NTA stosuje się jako środek zapobiegający osadzaniu kamienia kotłowego, jako środek komplek-

sujący jony metali podczas barwienia tkanin lub jako środek zapobiegający rozkładowi nadtlenuków i wodorosiarczków w przemyśle papierniczym.

Szkodliwe działanie NTA i jego soli może objawiać się uszkodzeniem nerek. Substancja może zaburzać gospodarkę niektórych metali (Zn, Ca) w tym narządzie, co może prowadzić do uszkodzenia komórek, proliferacji zmian, a nawet do zmian nowotworowych w układzie moczowym (Bruchajzer i in. 2021; PubChem 2022).

Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła NTA i jego sole do grupy 2B, czyli do grupy związków o możliwym działaniu rakotwórczym dla ludzi (IARC 1999).

NTA nie został ujęty w wykazie zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania substancji stwarzających zagrożenie w rozporządzeniu 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) n 790/2009) (Rozporządzenie... 2008). W tym rozporządzeniu została umieszczona

**Tabela 1.** Zharmonizowana klasyfikacja oraz oznakowanie soli trisodowej kwasu nitrylotrioctowego zgodnie z obowiązującymi aktami prawnymi (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008)

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Carc. 2 rakotwórczość – kategoria 2	H351 podejrzewa się, że powoduje raka
Acute Tox. 4 toksyczność ostra – kategoria 4	H302 działa szkodliwie po połknięciu
Eye Irrit. 2 działanie drażniące na oczy – kategoria 2	H319 działa drażniąco na oczy

sól trisodowa NTA, którą zaliczono do grupy związków rakotwórczych kategorii 2 (tab. 1). Zgodnie z danymi Europejskiej Agencji ds. Chemikaliów producenci wytwarzający NTA i pozostałe dostępne w handlu sole klasyfikują je jako substancje, co do których zachodzi podejrzenie, że powodują raka (rakotwórczość kat. 2, H351: podejrzewa się, że powoduje raka), działające szkodliwie po połknięciu (toksyczność ostra doustna kat. 4, H302: działa szkodliwie po połknięciu) oraz jako działające drażniąco na oczy (działanie drażniące kat. 2, H319: działa drażniąco na oczy).

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 NTA i jego soli w powietrzu środowiska pracy na poziomie  $3 \text{ mg/m}^3$  (Bruchajzer i in. 2021).

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania NTA w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary jego 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

W dostępnej literaturze nie znaleziono prac dotyczących oznaczania kwasu nitrylotrioctowego (NTA) w powietrzu. Właściwości fizykochemiczne NTA i jego soli sodowych wskazują, że mogą one występować w środowisku pracy w postaci

pyłów lub aerozoli. Z tego względu zdecydowano o wykorzystaniu do pobierania próbek filtrów z włókna szklanego umieszczonych w głowicach do pobierania frakcji wdychalnej.

Kwasy aminopolikarboksyłowe (AAPK), do grupy których oprócz NTA zalicza się również kwas (etylenodiamino)tetraoctowy (EDTA) i kwas pentetynowy (DTPA), są oznaczane w kosmetykach, detergentach, preparatach farmaceutycznych lub w wodzie (woda pitna, ścieki) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (Chiumiento 2015; Crosbie i in. 2003; Kemmei i in. 2007; 2013; Laine i in. 2005; Narola i in. 2011; O'Hanlon i in. 2019; Randt i in. 1993; Wang, Tomasella 2016) lub elektrochemiczną (Christison i in. 2016; Crosbie i in. 2003). Rzadziej wykorzystywana do tego celu jest technika spektrofotometrii w świetle widzialnym (Laine i in. 2005) lub technika chromatografii gazowej z detekcją mas (Randt i in. 1993). Do oznaczeń AAPK wykorzystuje się najczęściej kolumny typu C-30 (Kemmei i in. 2007; 2013), C-18 (Chiumiento 2015; Crosbie i in. 2003; Laine i in. 2005; Narola i in. 2011; O'Hanlon i in. 2019; Wang, Tomasella 2016) lub kolumny jonowymienne (Christison i in. 2016; Randt i in. 1993). W oznaczeniach metodami spektrofotometrycznymi wykorzystuje się zdolność AAPK do tworzenia kompleksów z jonami metali, takimi jak np.: żelazo, miedź lub kobalt. Z tego względu w analizach do wymywania kolumn często stosuje się fazę ruchomą złożoną z roztworu chlorku żelaza ( $\text{FeCl}_3$ ) w rozcieńczonym kwasie siarkowym (Kemmei i in. 2007; 2013; O'Hanlon i in. 2019). W innych pracach do rozdzielenia AAPK stosowano bardziej złożone fazy ruchome, takie jak: metanolowy roztwór octanu sodu i bromku tetrabutylamonowego (Chiumiento 2015; Laine i in. 2005; Narola i in. 2011), mieszanina acetonitrylu i buforu fosforanu

tetrabutylamonowego (Wang, Tomasella 2016) lub mieszanina fosforanu tetrabutylaminowego z dodatkiem metanolu (składnik A) i roztworu pięciowodnego siarczanu żelaza w kwasie siarkowym o stężeniu 0,1 mol/l (składnik B), (Crosbie

i in. 2003). Aby uprościć metodykę oznaczania NTA, zdecydowano o wykorzystaniu do elucji fazy złożonej z roztworu  $\text{FeCl}_3$  w kwasie siarkowym o stężeniu 5 mmol/l.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry wykonane z włókna szklanego o średnicy 25 mm. Do oznaczeń ilościowych postanowiono wykorzystać technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Przy opracowaniu metody oznaczania kwasu nitrylotriooctowego (NTA) w powietrzu przyjęto następujące założenia:

- pobór czterech próbek na zmianę roboczą
- objętość pobranego powietrza na jeden filtr 180 l
- zakres pomiarowy  $0,027 \div 1,08$  mg/filtr ( $0,0135 \div 0,54$  mg/ml), co dla próbki powietrza 180 l odpowiada zakresowi  $0,15 \div 6$  mg/m<sup>3</sup> ( $1/20 \div 2$  NDS).

### Aparatura, materiały i odczynniki

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

#### Aparatura:

- aspiratory indywidualne Gil Air 3000
- głowice (oprawki) umożliwiające pobranie frakcji wdychalnej
- chromatograf cieczowy firmy Waters Acquity Arc LC System – wyposażony w: poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, detektor spektrofotometryczny Waters 2489, termostat kolumny analitycznej, automatyczny dozownik próbek oraz komputer z programem sterowania i akwizycji danych

- kolumna analityczna Supelcosil LC SCX 250 mm × 4,6 mm × 5 μm wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami propyloowo-sulfonowymi
- kolumna analityczna Waters Spherisorb 250 mm × 2,1 mm × 5 μm
- mieszadło rolkowe
- waga analityczna (Sartorius)
- łaźnia ultradźwiękowa.

#### Materiały:

- filtry z włókna szklanego 25 mm
- filtry strzykawkowe z membraną z PTFE (Supelco)
- kolby miarowe o pojemności: 1, 5 i 1000 ml
- naczynka (wialki) szklane o pojemności 2 i 4 ml ze szkła oranżowego
- pipety automatyczne nastawne o pojemności  $0,010 \div 0,1$  ml,  $0,1 \div 1$  ml i  $0,5 \div 5$  ml.

#### Odczynniki:

- kwas nitrylotriooctowy (Merck)
- chlorek żelaza(III) heksahydrat (Merck)
- wodorotlenek sodu (POCH)
- kwas siarkowy (POCH)
- sól disodowa kwasu trinitrylooctowego (Merck)
- sól trisodowa kwasu trinitrylooctowego (Merck)
- kwas etylenodiaminotetraooctowy
- kwas dietylenotriaminopeptaoctowy
- woda o czystości do HPLC.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

### Dobór optymalnych warunków rozdziału chromatograficznego

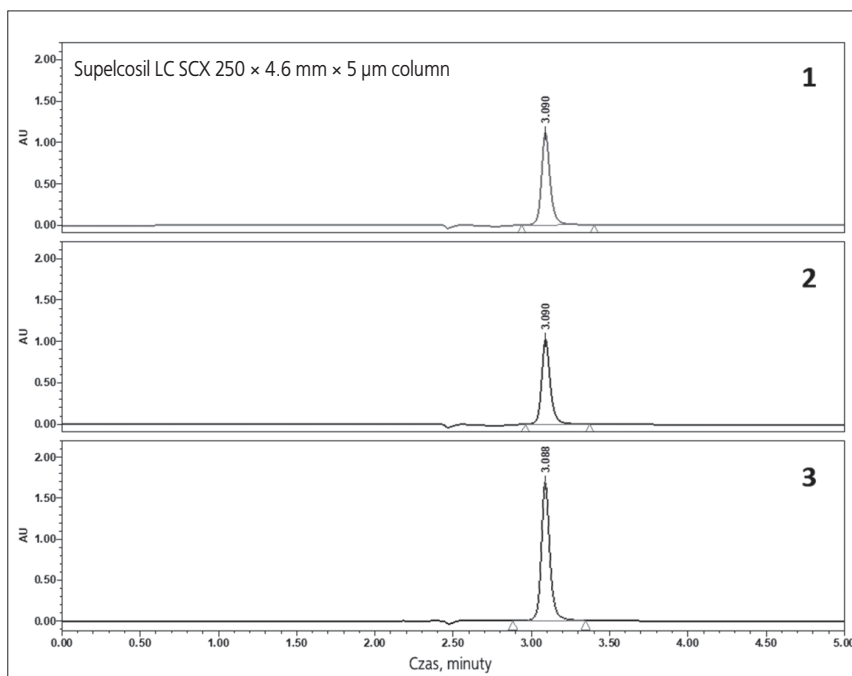
Obecność w badanej próbce substancji interferujących wymaga dobrania warunków rozdziału chromatograficznego (rodzaj kolumny analitycznej, modyfikacja składu fazy ruchomej), tak aby umożliwić selektywne oznaczenie kwasu nitrylotrioctowego (NTA). Z uwagi na słabą rozpuszczalność NTA w wodzie związek ten (oraz sole di- i trisodowe NTA) rozpuszczono w roztworze NaOH o stężeniu 0,2 mol/l, a otrzymane roztwory analizowano przy użyciu kolumny jonowymiennej Supelcosil LC SCX 250 mm × 4,6 mm (ziarno 5 μm) oraz kolumny Spherisorb 250 mm × 2,1 mm (ziarno 5 μm). Do wymywania zastosowano roztwór FeCl<sub>3</sub> o stężeniu 0,1 mmol/l w kwasie siarkowym o stężeniu 5 mmol/l.

W celu określenia selektywnych warunków oznaczania NTA przygotowano mieszaninę kwasu nitrylotrioctowego, kwasu etylenodiaminotetraoctowego oraz kwasu dietylenotriaminopepta-

octowego. Możliwość selektywnego oznaczania NTA testowano na obu wyżej wymienionych typach kolumn analitycznych przy zastosowaniu tej samej fazy ruchomej (0,1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> w 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Długość fali analitycznej λ = 260 nm i dobrano ją na podstawie danych literaturowych (Kemmerl i in. 2007).

Na rycinie 1 przedstawiono chromatogramy roztworów NTA oraz jego soli di- i trisodowej rozpuszczonych w 0,2 mol/l NaOH. Roztwory tych związków analizowano przy użyciu kolumny jonowymiennej Supelcosil LC SCX i fazy ruchomej złożonej z 0,1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> w 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzyskane czasy retencji wszystkich związków są identyczne, co wskazuje na to, że w zaproponowanych warunkach oznaczania NTA występuje w roztworze w postaci niezjonizowanej, natomiast po reakcji z jonami żelaza obecnymi w roztworze fazy ruchomej jest oznaczany w postaci kompleksu z tym metalem.

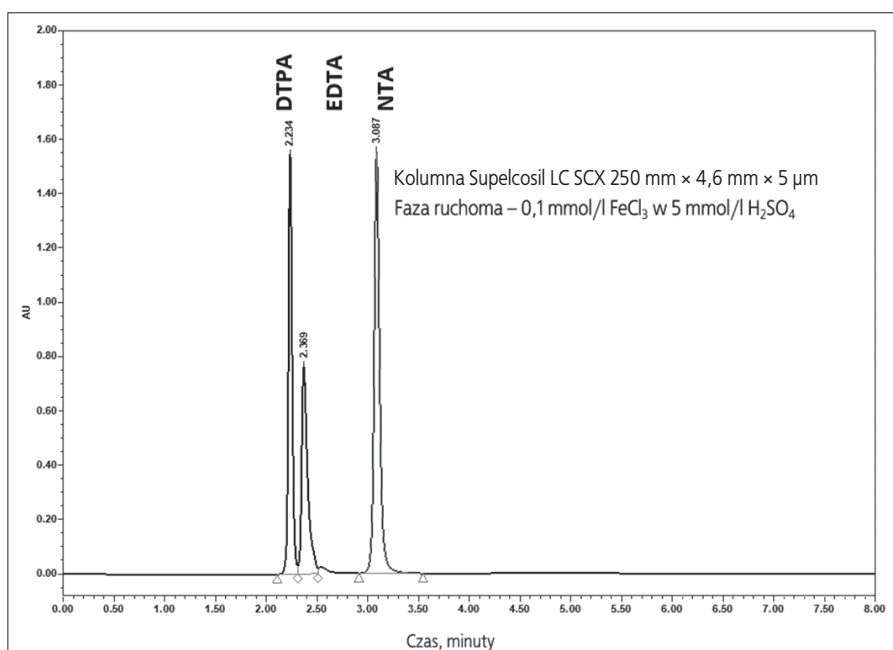
Na rycinach 2 i 3 przedstawiono chromatogramy mieszaniny NTA, EDTA i DTPA uzyskane



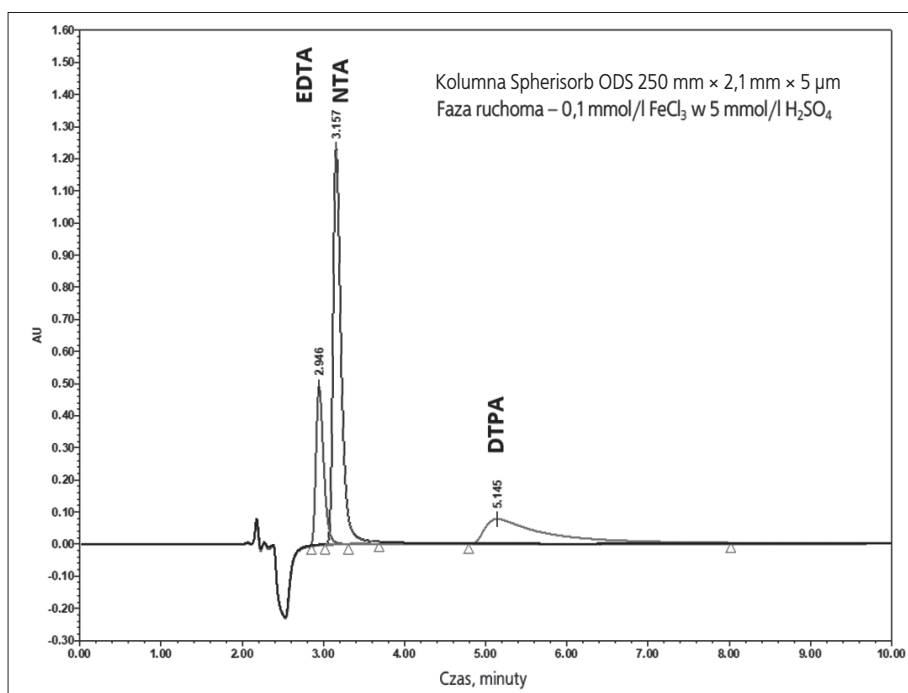
Rycina 1. Chromatogramy: (1) kwasu nitrylotrioctowego (NTA), (2) soli disodowej kwasu nitrylotrioctowego (NTA<sub>2</sub>Na) i (3) soli trisodowej kwasu nitrylotrioctowego (NTA<sub>3</sub>Na)

przy użyciu kolumn jonowymiennych Supelcosil LC SCX (ryc. 2) i Spherisorb ODS (ryc. 3), wymywanych mieszaniną 0,1 mmol/l  $\text{FeCl}_3$  w 5 mmol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Uzyskane dane wskazują, iż zastosowanie obu typów kolumn analitycznych zapewnia moż-

liwość selektywnego oznaczenia NTA w obecności innych związków chelatujących, jakkolwiek kolumna jonowymienna Supelcosil LC SCX zapewnia uzyskanie lepszego rozdzielania NTA od substancji współwystępujących.



**Rycina 2.** Chromatogramy kwasu nitylotrioctowego (NTA), kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i kwasu dietylenotriaminopetaoctowego (DTPA); kolumna Supelcosil LC SCX



**Rycina 3.** Chromatogramy kwasu nitylotrioctowego (NTA), kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i kwasu dietylenotriaminopetaoctowego (DTPA); kolumna Spherisorb ODS



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

Kolumna analityczna Supelcosil LC SCX 250 mm × 4,6 mm, 5 μm	
Faza ruchoma	0,1 mmol/l FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O w 5 mmol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Program	izokratycznie (v: v)
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 ml/min
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali analitycznej	λ = 260 nm
Objętość próbki	10 μl
Kolumna analityczna Waters Spherisorb 250 mm × 2,1 mm, 5 μm	
Faza ruchoma	0,1 mmol/l FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O w 5 mmol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Program	izokratycznie
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,3 ml/min
Temperatura kolumny	20°C
Długość fali analitycznej	λ = 260 nm
Objętość próbki	5 μl

W tabeli 2 podano warunki chromatografu cieczowego dla obu kolumn użytych w badaniach warunków rozdzielania chromatograficznego. Z uwagi na lepszy wynik rozdzielania chromatograficznego w przypadku kolumny jonowymiennej Supelcosil LC SCX w dalszych pracach nad opracowaniem metody oznaczania NTA stosowano tę kolumnę.

### Badanie zakresu stosowania, liniowości i precyzji metody analitycznej

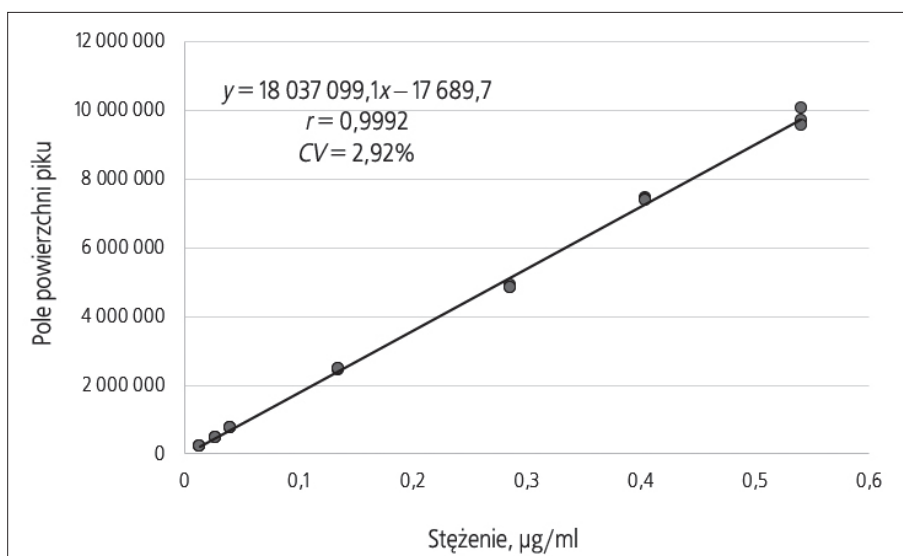
W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania kwasu nitrylotrioctowego (NTA) przygotowano trzy serie po osiem filtrów z włóka szklanego, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych NTA, przygotowanych w 0,2 mol/l NaOH, o stężeniach: 0; 0,27; 0,54; 1,08; 2,7; 5,4; 8,1 i 10,8 mg/ml, co odpowiada masom związku na filtry: 0; 0,027; 0,054; 0,108; 0,27; 0,54; 0,81 i 1,08 mg. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml, do których dodano po 2 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,2 mol/l. Próbkę poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła rolkowego. Uzyskane ekstrakty przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm i poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody w badanym zakresie stężeń przy długości fali λ = 260 nm przedstawiono w tabeli 3 i graficz-

nie na rycinie 4. Z uzyskanych danych wynika, że zależność odpowiedzi detektora spektrofotometrycznego na analizowane stężenia NTA w badanym zakresie stężeń 0,0135 ÷ 0,54 μg/ml ma charakter liniowy. Zależność tę opisuje równanie:  $y = 18\,037\,099,07x - 17\,689,7$ . Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) dla trzech serii kalibracyjnych wynosi 2,92%, a współczynnik regresji  $r = 0,9992$ .

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano trzy serie po dziesięć filtrów, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych NTA o stężeniach: 0,54; 2,7 i 10,8 μg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek o pojemności 4 ml, dodano po 2 ml NaOH o stężeniu 0,2 mol/l i poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła rolkowego. Ekstrakty po przesączeniu 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 NTA w powietrzu. Współczynniki zmienności (CV) rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 0,027; 0,135 i 0,54 μg/ml wynoszą odpowiednio: 0,54; 1,45 i 1,6%, a rozrzut wyników oznaczeń NTA w ekstraktach w stosunku do wartości zakładanej nie przekracza 1,47% dla trzech analizowanych stężeń, co świadczy o dużej dokładności oznaczeń.



Rycina 4. Krzywa wzorcowa kwasu nitrylotrioctowego (NTA) w zakresie 0,0135 ÷ 0,54 µg/ml

Tabela 3. Warunki wzorcowania kwasu nitrylotrioctowego (NTA) na filtrze z włókna szklanego

Badane parametry	Stężenie NTA, µg/ml						
	0,0135	0,027	0,0405	0,135	0,285	0,405	0,54
Pole powierzchni pików (PPP)	244 378 244 363 242 326	478 197 477 374 485 271	750 548 759 225 768 770	2 408 017 2 468 540 2 459 793	4 902 266 4 847 040 4 846 673	7 439 238 7 404 109 7 372 367	9 683 106 10 051 386 9 540 465
Średnia PPP	243 689,0	480 280,7	759 514,3	2 445 450,0	4 865 326,3	7 405 238,0	9 758 319,0
Odchylenie standardowe, SD	1 180,4	4 341,3	9 114,4	32 711,6	31 991,2	33 449,8	263 633,9
Współczynnik zmienności, CV, %	0,48	0,90	1,20	1,34	0,66	0,45	2,70

Tabela 4. Wyniki badania precyzji metody oznaczania kwasu nitrylotrioctowego (NTA)

Numer analizy	Stężenie NTA, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1		0,0268		0,1351		0,5420
2		0,0267		0,1368		0,5642
3		0,0270		0,1371		0,5336
4		0,0265		0,1363		0,5352
4		0,0266	0,135	0,1371	0,54	0,5383
6	0,027	0,0265		0,1370		0,5361
7		0,0266		0,1369		0,5378
8		0,0266		0,1376		0,5389
9		0,0267		0,1377		0,5368
10		0,0266		0,1371		0,5390
Średnia		0,0267		0,1369		0,5402
Odchylenie standardowe, SD		0,0001		0,001		0,009
Współczynnik zmienności, CV, %		0,54		0,54		1,62



## Badanie warunków pobierania próbek powietrza

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na retencję kwasu nitrylotrioctowego (NTA) na filtry z włókna szklanego przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych NTA o stężeniach: 0,54; 2,7 i 10,8 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w głowicach do pobierania próbek powietrza i przepuszczono przez nie 180 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/h. Po tym czasie filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml roztworu NaOH o stężeniu 0,2 mol/l. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$ , a następnie poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcze-

śniej warunkach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów z filtrów, na które naniesiono roztwory wzorcowe NTA o takich samych stężeniach, przez które nie przepuszczano powietrza.

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza przedstawiono w tabeli 5. Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analitu. Średnie wartości wydajności ekstrakcji NTA z filtra, przez który przepuszczono 180 l powietrza, dla trzech analizowanych zawartości (0,027; 0,054 i 1,08  $\mu\text{g}$  na filtrze) wynoszą odpowiednio: 101,1% ( $SD - 1,78$ ); 103,9% ( $SD - 6,97$ ) i 99,5% ( $SD - 0,74$ ). Średnia dla trzech stężeń wartość wydajności ekstrakcji wynosi 101,5% ( $SD - 4,34$ ).

**Tabela 5.** Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń kwasu nitrylotrioctowego (NTA)

Medium pochłaniające	Masa NTA na filtrze, $\mu\text{g}$	Pole powierzchni pików		Wydajność ekstrakcji, %	Średnia wartość wydajności ekstrakcji, %
		roztwór kontrolny	roztwór po ekstrakcji		
Filtr z włókna szklanego	0,054		480 334	99,6	101,1
			480 170	99,6	
			493 834	102,4	
		482 322	482 265	100,0	
		483 318	487 319	101,0	
		481 197	501 533	104,0	
			$SD$ 1,78		
			$CV$ 1,76		
	0,27			2 570 060	103,8
			2 790 106	112,7	
			2 777 850	112,2	
2 468 251		2 430 452	98,2		
2 479 175		2 431 792	98,2		
2 480 984		2 432 677	98,2		
		$SD$ 6,97			
		$CV$ 6,71			
1,08			9 745 984	100,8	99,5
			9 620 385	99,5	
			9 533 172	98,6	
	9 636 316	9 573 656	99,1		
	9 662 793	9 614 571	99,5		
	9 696 088	9 614 539	99,5		
		$SD$ 0,74			
		$CV$ 0,74			
Średni współczynnik odzysku, $\bar{S}$ , %			101,5		
Odchylenie standardowe, $SD$			4,34		
Współczynnik zmienności $CV$ , %			4,28		

## Badanie trwałości próbek NTA na filtrach z włókna szklanego

W celu zbadania trwałości pobranych na filtry z włókna szklanego próbek zawierających kwas nitrylotrioctowy (NTA) przygotowano dwie serie po osiemnaście filtrów, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych NTA o stężeniach: 0,54; 2,7 i 10,8 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w naczynkach szklanych o pojemności 4 ml, szczelnie zamknięto i umieszczono w chłodziarce. Po 7 i 14 dniach przechowywania poddawano je ekstrakcji po sześć próbek z każdego stężenia. Ekstrakty przepuszczono przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE do naczynek o pojemności 2 ml i poddawano analizie chromatograficznej. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania próbek NTA pobranych na filtry z włókna szklanego przedstawiono w tabeli 6. Wyniki wykonanych badań wskazują, że próbki NTA pobrane na filtr i przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 14 dni. Wyrażone w procentach średnie wartości wydajności ekstrakcji dla poszczególnych mas NTA na filtrze (0,054; 0,27 i 1,08 µg/filtr) po 14 dniach przechowywania wynoszą odpowiednio: 101% (*SD*

– 1,45); 99,5% (*SD* – 1,24) i 100,4% (*SD* – 0,51). Średnia dla trzech stężeń wartość wydajności ekstrakcji po 14 dniach przechowywania wynosi 100,3% (*SD* – 1,28).

## Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności metody

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności kwasu nitrylotrioctowego (NTA) przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (2000).

Przygotowano dwadzieścia filtrów z włókna szklanego, które umieszczono w naczynkach o pojemności 4 ml, dodano po 2 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,2 mol/l, a następnie poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła rolkowego. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki analiz dotyczących wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności NTA z zastosowaniem techniki HPLC UV-VIS przedstawiono w tabeli 7. Obliczone z uwzględnieniem wartości średniej i odchylenia standardowego sygnału tła o czasie retencji NTA oraz z uwzględnieniem współczynnika nachylenia krzywej wzorcowej granice wykrywalności i oznaczania ilościowego metody wynoszą odpowiednio 0,000011 i 0,000036 mg/ml.

**Tabela 6.** Trwałość próbek kwasu nitrylotrioctowego (NTA) pobranych na filtr z włókna szklanego w zależności od czasu przechowywania

Czas, liczba dni	Masa NTA na filtrze, µg								
	0,054			0,27			1,08		
7	103,5%	98,5%	102,3%	103,0%	100,0%	108,0%	102,1%	102,2%	102,3%
	99,1%	98,6%	100,3%	100,4%	103,0%	109,3%	102,2%	102,4%	101,8%
	<i>Śr</i>	100,4%		<i>Śr</i>	104,0%		<i>Śr</i>	102,1%	
	<i>SD</i>	2,08		<i>SD</i>	3,85		<i>SD</i>	0,20	
	<i>CV</i>	2,07%		<i>CV</i>	3,70%		<i>CV</i>	0,20%	
	Średni współczynnik wydajności ekstrakcji, <i>Śr</i>			102,19%					
	Odchylenie standardowe, <i>SD</i>			2,83					
	Współczynnik zmienności, <i>CV</i>			2,77%					
14	101,7%	100,8%	99,9%	99,9%	99,2%	98,5%	100,4%	100,4%	100,2%
	100,8%	99,7%	103,7%	101,7%	98,2%	99,5%	100,6%	99,6%	101,2%
	<i>Śr</i>	101%		<i>Śr</i>	99,5%		<i>Śr</i>	100,4%	
	<i>SD</i>	1,45		<i>SD</i>	1,24		<i>SD</i>	0,51	
	<i>CV</i>	1,43%		<i>CV</i>	1,25%		<i>CV</i>	0,51%	
	Średni współczynnik wydajności ekstrakcji, <i>Śr</i>			100,3%					
	Odchylenie standardowe, <i>SD</i>			1,28					
	Współczynnik zmienności, <i>CV</i>			1,28%					

**Tabela 7.** Wyznaczanie granic wykrywalności (GW) i oznaczalności (GO)

Wyznaczone parametry	Wartości sygnału (pole powierzchni pików)	
		580 441 385 503 324 450 355 492 378 389
Średnie pole powierzchni, $n = 20$	413,5	
Odchylenie standardowe, $S$	64,5	
Współczynnik zmienności, CV, %	15,6	
Granica wykrywalności (GW), mg/ml	0,00001075	
Granica oznaczalności (GO), mg/ml	0,00003584	

### 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 0,0135 ÷ 0,54 µg/ml (0,15 ÷ 6,0 mg/m<sup>3</sup> dla próbki powietrza 180 l)

- granica wykrywalności 0,011 µg/ml
- granica oznaczalności 0,036 µg/ml
- współczynnik korelacji  $r = 0,9992$
- niepewność rozszerzona metody 21,3%.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania kwasu nitrylotrioctowego (NTA) i jego soli w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Wskazania detektora UV-VIS w funkcji stężenia NTA w badanym zakresie stężeń (0,0135 ÷ 0,54 µg/ml) mają charakter liniowy. Do zatrzymania pyłów lub aerozolu NTA albo jego soli z powietrza należy stosować filtry z włókna szklanego, które następnie są ekstrahowane przy użyciu roztworu NaOH (0,2 mol/l). Wyrażona w procentach wydajność ekstrakcji NTA z filtrów wynosi 101,5. Próbk

NTA pobrane na filtry z włókna szklanego przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez min. 14 dni. Opisaną metodą umożliwia oznaczanie NTA w powietrzu na stanowiskach pracy w stężeniach od 0,15 mg/m<sup>3</sup>, czyli od ok. 1/20 proponowanej wartości NDS. Przedstawiona metoda umożliwia oznaczanie NTA w obecności innych związków chelatujących mogących występować w badanym powietrzu. Opracowaną metodę oznaczania NTA w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

## INTRODUCTION

Nitrilotriacetic acid (NTA), like its mono-, di- and trisodium salts, is a white, crystalline solid at a room temperature. Unlike its sodium salts, NTA is very poorly soluble in water and is insoluble in most organic solvents. It dissolves in ethanol and is poorly soluble in dimethyl sulphoxide.

NTA sodium salts such as NTA disodium salt, NTA trisodium salt and NTA trisodium salt monohydrate are commercially available, while the other salts (NTA sodium salt, NTA monosodium salt, disodium salt monohydrate) are not.

NTA is produced, for example, in a reaction of formaldehyde and ammonia, whose product (hexamethylenetetramine) undergoes a reaction with hydrogen cyanide in sulphuric acid. The resulting triscyanomethylamine is subjected to saponification with NaOH, the final product of which is NTA trisodium salt, and aqueous solution of substrate, after acidification (pH 1–2), yields pure NTA (PubChem 2022).

NTA is used to prevent scale deposition, as an agent for complexing metal ions during fabric dyeing or as a means to prevent decomposition of peroxides and hydrosulphides in the paper industry.

The harmful effects of NTA and its salts may manifest as kidney injury. NTA may disturb the metabolism of some metals (Zn, Ca) in this organ, which can lead to cell damage, proliferation of lesions and even cancerous lesions in the urinary tract (Bruchajzer et al. 2021; PubChem 2022).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) included NTA and its salts into group 2B, i.e. as being possibly carcinogenic to humans (IARC 1999).

NTA is not included in the harmonised classification and labelling of hazardous substances under 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 (Commission Regulation (EC) No 790/2009) (Regulation ... 2008). This Regulation mentions NTA trisodium salt, which is included in the group of carcinogenic compounds category 2 (Table 1). According to data from the European Chemical Agency, manufacturers producing NTA and other commercially available salts classify them as suspected carcinogens (carcinogenicity category 2, H351 – suspected to cause cancer), harmful if swallowed (acute oral toxicity category 4, H302 – harmful if swallowed) and as eye irritants (irritating effect category 2, H319 – eye irritant).

The Team of Experts for Chemical Agents of the Inter-ministry Committee on TLV and PEL of the Occupational Hazard Agents proposed the maximum allowable concentration (threshold limit value – TLV) for NTA and its salts in workplace air at 3 mg/m<sup>3</sup> (Bruchajzer et al. 2021).

The aim of the study was to develop an appropriately sensitive and selective method for determination of NTA in workplace air, enabling measurements of its concentrations according to the requirements of PN-EN 482, followed by an assessment of occupational exposure.

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

**Table 1.** Classification and labelling of nitrilotriacetic acid trisodium salt in accordance with the applicable legal acts (Regulation (EC) No 1272/2008)

Hazard classification and category codes	Hazard statement codes
Carc. 2 carcinogenicity – category 2	H351 suspected of causing cancer
Acute Tox. 4 acute toxicity – category 4	H302 harmful if swallowed
Eye Irrit. 2 eye irritation – category 2	H319 causes serious eye irritation

## Assumptions of the method

No papers on the determination of nitrilotriacetic acid (NTA) in the air were found in the available literature. The physicochemical properties of NTA and its sodium salts indicate that they may be present in the working environment as dusts or aerosols. Therefore, it was decided to use glass fibre filters placed in the breathable fraction sampling heads for the collection of samples.

Aminopolycarboxylic acids (APCA), which, in addition to NTA, also include (ethylenediamine) tetraacetic acid (EDTA) and pentetic acid (DTPA), are determined in cosmetics, detergents, pharmaceutical formulations and water (drinking water, wastewater) by means of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (Chiumiento 2015; Crosbie et al. 2003; Kemmei et al. 2007; 2013; Laine et al. 2005; Narola et al. 2011; O'Hanlon et al. 2019; Randt et al. 1993; Wang, Tomasella 2016) or by electrochemical methods (Crosbie et al. 2003; Christison et al. 2016). The visible light spectrophotometry technique (Laine et al. 2005) and mass-detection gas chromatography (Randt et al. 1993) are less commonly used for this purpose. Type C-30 (Kemmei et al. 2007; 2013), C-18 (Chiumiento 2015;

Crosbie et al. 2003; Laine et al. 2005; Narola et al. 2011; O'Hanlon et al. 2019; Wang, Tomasella 2016) or ion exchange columns are the most commonly used for APCA assays (Christison et al. 2016; Randt et al. 1993). The ability of APCA to form complexes with metal ions, such as iron, copper or cobalt, is employed in determinations using spectrophotometric methods. Therefore, a mobile phase composed of an iron chloride solution ( $\text{FeCl}_3$ ) in dilute sulphuric acid is often used as an eluent (Kemmei et al. 2007; 2013; O'Hanlon et al. 2019). More complex mobile phases, such as: a methanol solution of sodium acetate and tetrabutylammonium bromide (Chiumiento 2015; Laine et al. 2005; Narola et al. 2011), a mixture of acetonitrile and tetrabutylammonium phosphate buffer (Wang, Tomasella 2016) or a tetrabutylamine phosphate mixture with methanol (component A) and an iron sulphate pentahydrate solution in 0.1 mol/l sulphuric acid (component B), (Crosbie et al. 2003) were used for the separation of APCA in other studies. In order to simplify the NTA assay methodology, it was decided to use a phase consisting of  $\text{FeCl}_3$  in 5 mmol/l sulphuric acid for elution.

## EXPERIMENTAL PART

Glass fibre filters with a diameter of 25 mm were used for air sampling. High performance liquid chromatography with spectrophotometric detection was used for quantitative determination.

The following assumptions were made for the method for determining NTA in the air:

- collection of four samples per shift
- the amount of air collected per filter – 180 l
- measurement range 0.027–1.08 mg/filter (0.0135–0.54 mg/ml), which for a 180-litre air sample is equivalent to a range of 0.15 mg/m<sup>3</sup> to 6 mg/m<sup>3</sup> (1/20–2 TLV).

### Equipment, materials and reagents

All the tests were performed with the analytical equipment, materials and reagents listed below.

### Equipment:

- Gil Air 3000 individual aspirators
- heads enabling collection of the breathable fraction
- Waters Acquity Arc LC System liquid chromatograph – fitted with: a quadruple system of high-pressure pumps, a Waters 2489 spectrophotometric detector, an analytical column thermostat, an automatic sample injector and a computer with the control and data acquisition software
- Supelcosil LC SCX 250 mm × 4.6 mm × 5 μm analytical column, packed with silica gel modified with propyl-sulphonic groups
- Waters Spherisorb 250 mm × 2.1 mm × 5 μm analytical column
- tube roller
- Sartorius analytical balance
- ultrasonic cleaner.



### Materials:

- 25 mm glass fibre filters
- syringe filters with a PTFE membrane (Supelco)
- 1, 5 and 1000 ml volumetric flasks
- 2 and 4 ml glass bottles (vials) made of amber glass
- 0.010–0.1, 0.1–1 and 0.5–5 ml automatic adjustable pipettes.

### Reagents:

- nitrilotriacetic acid (Merck)
- iron (III) chloride hexahydrate (Merck)
- sodium hydroxide (POCH)
- sulphuric acid (POCH)
- trinitrioloacetic acid disodium salt (Merck)
- trinitrioloacetic acid trisodium salt (Merck)
- ethylenediaminetetraacetic acid
- diethylenetriaminepentaacetic acid
- HPLC grade water.

## TEST RESULTS AND THEIR REVIEW

### Choice of optimal conditions for chromatographic separation

The presence of interfering substances in the test sample requires the selection of chromatographic separation conditions (analytic column type, modification of the mobile phase composition) in order to allow for selective determination of nitrilotriacetic acid (NTA). Due to the poor solubility of NTA in water, the compound (and its di- and trisodium salts) was dissolved in 0.2 mol/l solution of NaOH, and the resulting solutions were analysed on a Supelcosil LC SCX 250 × 4.6 mm cation-exchange column (grain 5 µm) and the Spherisorb 250 × 2.1 column (grain 5 µm). The solution of 0.1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> in 5 mmol/l sulphuric acid was used as an eluent.

In order to determine the selective NTA assay conditions, a mixture of nitrilotriacetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid and diethylene triaminepentaacetic acid was prepared. The possibility of selective determination of NTA was tested on both of the above-mentioned types of analytical columns with the same mobile phase (0.1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> in 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The analytical wavelength is  $\lambda = 260$  nm, selected based on literature data (Kemmerl et al. 2007).

Figure 1 shows chromatograms of solutions of NTA and its di- and trisodium salts dissolved in 0.2 mol/l NaOH. The solutions of these compounds were analysed on a Supelcosil

LC SCX cation-exchange column with the mobile phase of 0.1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> in 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The retention times of all compounds are identical, which indicates that under the proposed determination conditions, NTA is present in a non-ionised form in the solution, whereas it is determined as a complex with iron after the reaction with this metal present in the mobile phase.

Figures 2 and 3 show chromatograms of an NTA, EDTA and DTPA mixture obtained on Supelcosil LC SCX cation-exchange columns (Fig. 2) and Spherisorb ODS column (Fig. 3), washed out with a mixture of 0.1 mmol/l FeCl<sub>3</sub> in 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The data indicate that the use of both types of analytical columns ensures a selective NTA assay in the presence of other chelating agents, although the Supelcosil LC SCX cation-exchange column gives better separation of NTA from the concomitant substances.

Table 2 shows the conditions of liquid chromatography for both columns used for examination of chromatographic separation conditions. Due to the better result of chromatographic separation, the Supelcosil LC SCX cation-exchange column was used in further studies aimed at the development of the NTA assay method.



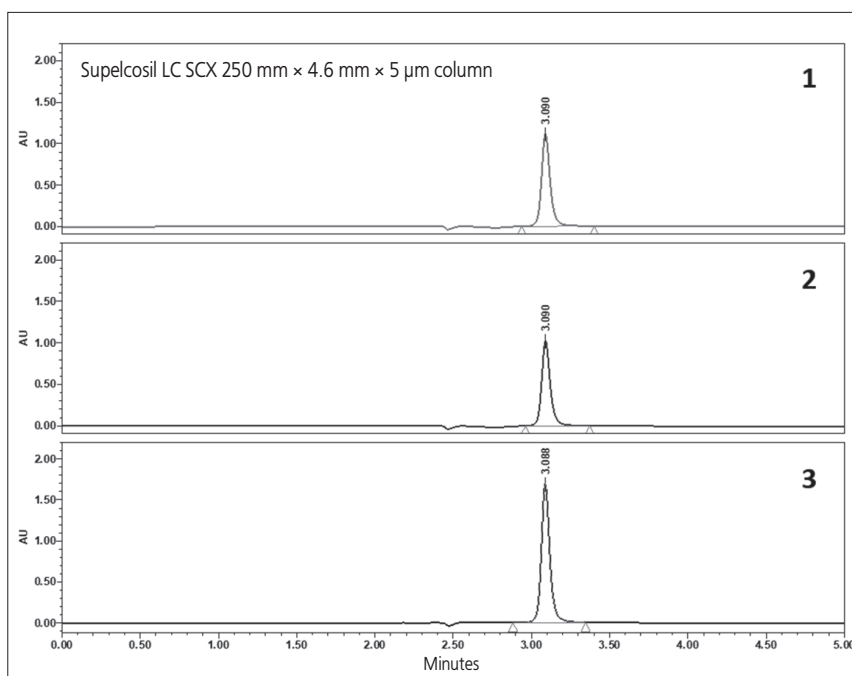


Figure 1. Chromatograms of (1) nitrilotriacetic acid (NTA), (2) nitrilotriacetic acid disodium salt (NTA<sub>2</sub>Na) and (3) nitrilotriacetic trisodium salt (NTA<sub>3</sub>Na)

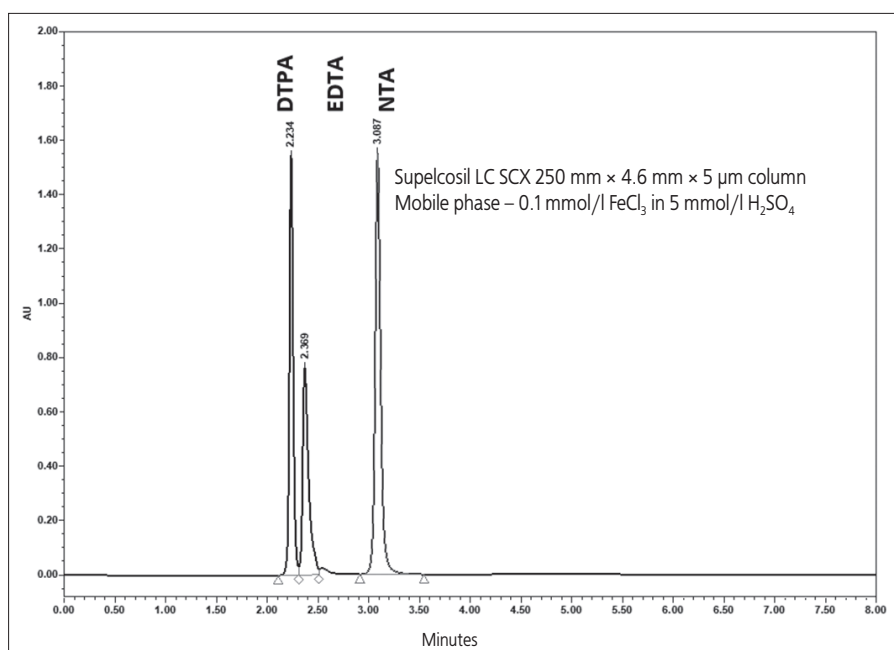
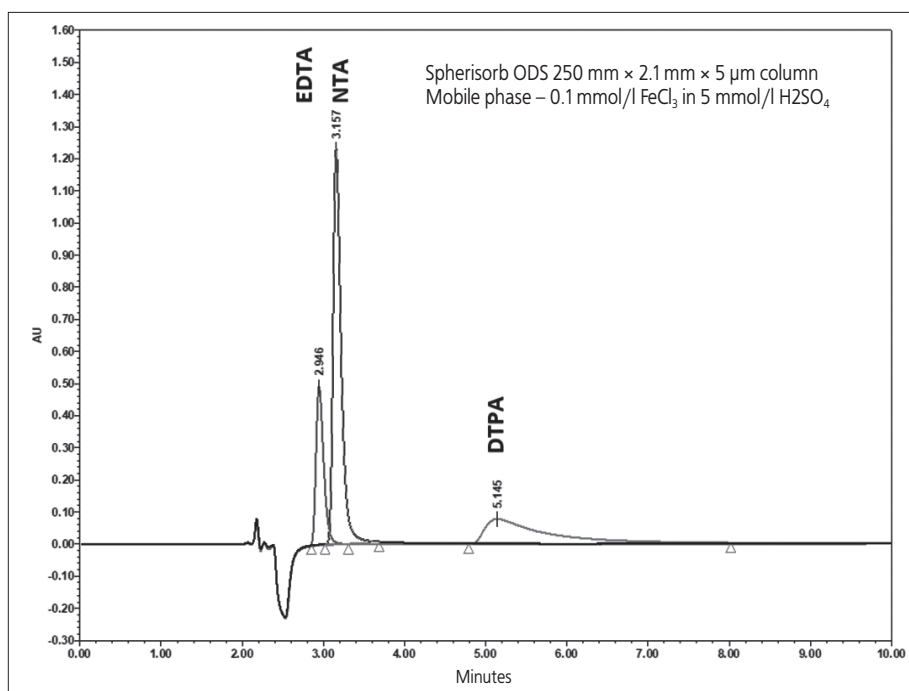


Figure 2. Chromatograms of nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA); Supelcosil LC SCX column



**Figure 3.** Chromatograms of nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA); Spherisorb ODS column

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

Supelcosil LC SCX 250 mm x 4.6 mm, 5 µm, analytical column	
Mobile phase	0.1 mmol/l FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O in 5 mmol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Program	isocratic (v:v)
Mobile phase flow rate	1 ml/min
Column temperature	30°C
Analytical wavelength	λ – 260 nm
Sample volume	10 µl
Waters Spherisorb 250 mm x 2.1 mm, 5 µm, analytical column	
Mobile phase	0.1 mmol/l FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O in 5 mmol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Program	isocratic
Mobile phase flow rate	0.3 ml/min
Column temperature	20 °C
Analytical wavelength	λ – 260 nm
Sample volume	5 µl

**Testing the scope, linearity and precision of the analytical method**

In order to test the working range of the method for nitrilotriacetic acid (NTA) determination,

3 batches of 8 glass fibre filters were prepared, onto which 0.1 ml of NTA calibration solutions prepared in 0.2 mol/l NaOH were applied, with the following concentrations: 0, 0.27, 0.54, 1.08,

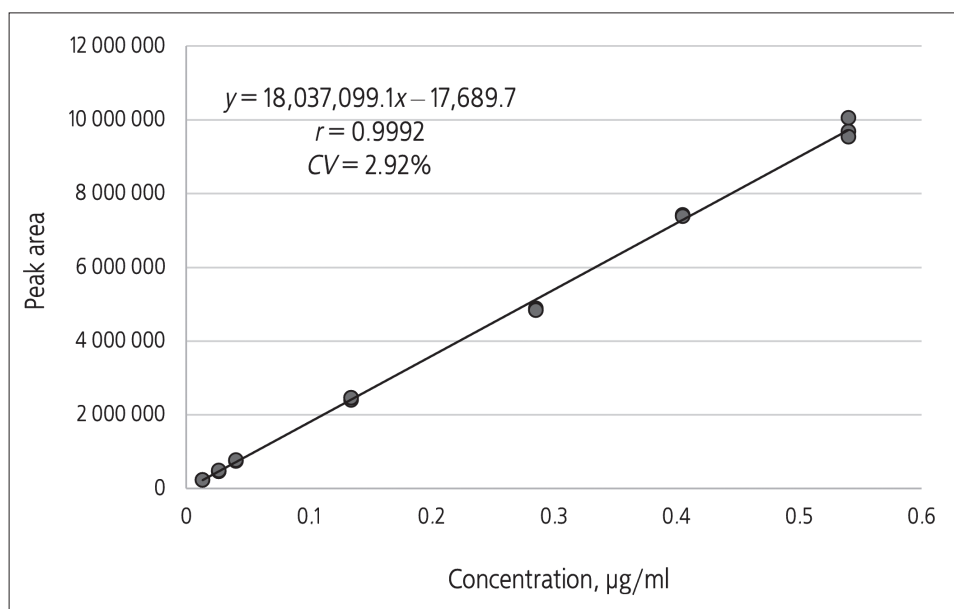
2.7, 5.4, 8.1 and 10.8 mg/ml, which corresponds to the masses of the compound on the filter: 0, 0.027, 0.054, 0.108, 0.27, 0.54, 0.81 and 1.08 mg. After the solvent had been evaporated, the filters were transferred to 4 ml glass vessels to which 2 ml of 0.2 mol/l sodium hydroxide solution was added. The samples were extracted with a tube roller for 30 minutes. The extracts were passed through syringe filters with a PTFE membrane of 0.45 µm pore diameter and analysed chromatographically.

The results of the method linearity testing within the tested concentration range at the

wavelength of  $\lambda = 260$  nm are shown in Table 3 and, graphically, in Figure 4. The data demonstrate the linearity of the correlation between the spectrophotometric detector response and the analysed NTA concentrations within the tested concentration range 0.0135–0.54 µg/ml. This correlation is described by the equation:  $y = 18,037,099.07x - 17,689.7$ . The coefficient of variation (CV) expressed as a percentage for 3 calibration runs is 2.92%, and the regression coefficient  $r = 0.9992$ .

**Table 3.** Calibration conditions for nitilotriacetic acid (NTA) on a glass fibre filter

Tested parameters	NTA concentration, µg/ml						
	0.0135	0.027	0.0405	0.135	0.285	0.405	0.54
Peak area	244,378 244,363 242,326	478,197 477,374 485,271	750,548 759,225 768,770	2,408,017 2,468,540 2,459,793	4,902,266 4,847,040 4,846,673	7,439,238 7,404,109 7,372,367	9,683,106 10,051,386 9,540,465
Mean peak area	243,689.0	480,280.7	759,514.3	2,445,450.0	4,865,326.3	7,405,238.0	9,758,319.0
Standard deviation, SD	1,180.4	4,341.3	9,114.4	32,711.6	31,991.2	33,449.8	263,633.9
Coefficient of variation CV, %	0.48	0.90	1.20	1.34	0.66	0.45	2.70



**Figure 4.** Standard curve for NTA in the range of 0.0135–0.54 µg/ml

**Table 4.** Results of precision test for determining NTA

Analysis number	NTA concentration, mg/ml					
	assumed	determined	assumed	determined	assumed	determined
1	0.027	0.0268	0.135	0.1351	0.54	0.5420
2		0.0267		0.1368		0.5642
3		0.0270		0.1371		0.5336
4		0.0265		0.1363		0.5352
4		0.0266		0.1371		0.5383
6		0.0265		0.1370		0.5361
7		0.0266		0.1369		0.5378
8		0.0266		0.1376		0.5389
9		0.0267		0.1377		0.5368
10		0.0266		0.1371		0.5390
Mean		0.0267		0.1369		0.5402
Standard deviation ( <i>SD</i> )		0.0001		0.001		0.009
Coefficient of variation ( <i>CV</i> ), %		0.54		0.54		1.62

In order to test the consistency of results when repeating the determination multiple times, 3 series of 10 filters each were prepared, onto which 0.1 ml of NTA calibration solutions were applied at the following concentrations: 0.54, 2.7 and 10.8 mg/ml. After the solvent evaporation, the filters were transferred to 4 ml vessels, to which 2 ml of 0.2 mol/l of NaOH was added, and were subjected to a 30-minute extraction using a tube roller. After filtration, the extracts were analysed by chromatography.

The precision tests results are shown in Table 4. They indicate that the assumed conditions of the analysis allow for precise performance of NTA determination in the air. The coefficients of variation (*CV*) of dispersion of results obtained relative to the mean values for the following concentrations: 0.027, 0.135 and 0.54 µg/ml are as follows: 0.54%, 1.45% and 1.6%, and the dispersion of NTA assay results in extracts does not exceed 1.47% for the 3 analysed concentrations, which proves a high accuracy of assays.

### Investigation of air sampling conditions

In order to test the effect of the assumed air sampling conditions on the nitrilotriacetic acid (NTA) retention on a glass fibre filter, 3 series of 6 filters each were prepared to which 0.1 ml of NTA calibration solutions at the following concentrations: 0.54, 2.7 and 10.8 mg/ml was applied. After evaporation, the filters were placed in the air sampling heads and 180 litres of air with

a constant flow rate of 2 l/h were passed through them. After that time, the filters were transferred to 4 ml glass vessels and subjected to a 30-minute extraction using 2 ml of 0.2 mol/l NaOH solution. The extracts were filtered through PTFE syringe filters with the pore diameter of 0.45 µm and then analysed chromatographically under the pre-specified conditions. The test compound peak areas obtained from extract analyses were compared with those of extracts from filter to which NTA calibration solutions of the same concentrations were applied, through which no air was transferred.

The test results for air sampling conditions are presented in Table 5. The adopted method of air sampling does not result in significant loss of the analyte. The average NTA extraction efficiency values from a filter through which 180 litres of air were passed, for the 3 tested contents (0.027, 0.054 and 1.08 µg per filter), are: 101.1% (*SD* – 1.78), 103.9% (*SD* – 6.97) and 99.5% (*SD* – 0.74), respectively. The mean extraction efficiency value for 3 concentrations is 101.5% (*SD* – 4.34).

### Stability testing of NTA samples on glass fibre filters

In order to test the stability of samples containing nitrilotriacetic acid (NTA) collected on glass fibre filters, 2 series of 18 filters were prepared, onto each of which 0.1 ml of NTA calibration solution was applied at concentrations of: 0.54, 2.7 and 10.8 mg/ml. After the solvent evaporated,

**Table 5.** Examination of the air sampling conditions for the determination of NTA

Absorbent medium	NTA mass on a filter, mg	Peak area		Extraction efficiency, %	Mean extraction efficiency value, %
		control solution	solution after extraction		
Glass fibre filter	0.054	482,322 483,318 481,197	480,334	99.6	101.1
			480,170	99.6	
			493,834	102.4	
			482,265	100.0	
			487,319	101.0	
			501,533	104.0	
		<i>SD</i> 1.78			
		<i>CV</i> 1.76			
	0.27	2,468,251 2,479,175 2,480,984	2,570,060	103.8	103.9
2,790,106			112.7		
2,777,850			112.2		
2,430,452			98.2		
2,431,792			98.2		
2,432,677			98.2		
	<i>SD</i> 6.97				
	<i>CV</i> 6.71				
1.08	9,636,316 9,662,793 9,696,088	9,745,984	100.8	99.5	
		9,620,385	99.5		
		9,533,172	98.6		
		9,573,656	99.1		
		9,614,571	99.5		
		9,614,539	99.5		
	<i>SD</i> 0.74				
	<i>CV</i> 0.74				
Mean recovery rate (mean), %			101.5		
Standard deviation ( <i>SD</i> )			4.34		
Coefficient of variation ( <i>CV</i> ), %			4.28		

the filters were put into 4 ml glass vessels, closed tightly and placed in the refrigerator. After 7 and 14 days of storage, 6 samples of each concentration were extracted. The extracts were passed through syringe filters with a PTFE membrane into 2 ml vessels and analysed chromatographically. The test compound peak areas obtained from the extract analyses were compared with the results of the analyses of the standard extracts of the same concentrations prepared on the day of analysis.

The results of the storage conditions of NTA samples collected on glass fibre filters are shown in Table 6. The test results show that NTA samples collected on a filter and stored in the refrigerator remain stable for at least 14 days. The mean extraction values for individual NTA masses on filter, expressed in as percentage (0.027, 0.054 and 1.08 µg per filter) after 14 days of storage are: 101% (*SD* – 1.45), 99.5% (*SD* – 1.24) and 100.4% (*SD* – 0.51), respectively. The mean extraction efficiency value for 3 concentrations after 14 days of storage is 100.3% (*SD* – 1.28).

### Determination of the method limits of detection and quantitation

The limits of nitrilotriacetic acid (NTA) detection and quantitation were tested in accordance with the guidelines provided in *Dobecki* 2000.

Twenty glass fibre filters were prepared and placed in 4 ml vessels, 2 ml of 0.2 mol/l sodium hydroxide solution was added to each, and subsequently they were extracted with a tube roller for 30 minutes. The extracts were filtered through PTFE syringe filters with pore diameter of 0.45 µm and then analysed chromatographically.

The results of the determination of limits of detection and quantitation of NTA with HPLC UV-VIS technique are shown in Table 7.

Calculated taking into account the mean value and the standard deviation of the background signal with NTA retention time and taking into account the calibration curve slope coefficient, the limits of detection and quantitation of the method are 0.000011 and 0.000036 mg/ml, respectively.

**Table 6.** Stability of NTA samples collected on glass fibre filters depending on storage time

Time, number of days	NTA mass on a filter, µg								
	0.054			0.27			1.08		
7	103.5%	98.5%	102.3%	103.0%	100.0%	108.0%	102.1%	102.2%	102.3%
	99.1%	98.6%	100.3%	100.4%	103.0%	109.3%	102.2%	102.4%	101.8%
	<i>Mean</i>	100.4%		<i>Mean</i>	104.0%		<i>Mean</i>	102.1%	
	<i>SD</i>	2.08		<i>SD</i>	3.85		<i>SD</i>	0.20	
	<i>CV</i>	2.07%		<i>CV</i>	3.70%		<i>CV</i>	0.20%	
	Average extraction efficiency ratio ( <i>mean</i> )			102.19%					
	Standard deviation ( <i>SD</i> )			2.83					
	Coefficient of variation ( <i>CV</i> )			2.77%					
14	101.7%	100.8%	99.9%	99.9%	99.2%	98.5%	100.4%	100.4%	100.2%
	100.8%	99.7%	103.7%	101.7%	98.2%	99.5%	100.6%	99.6%	101.2%
	<i>Mean</i>	101%		<i>Mean</i>	99.5%		<i>Mean</i>	100.4%	
	<i>SD</i>	1.45		<i>SD</i>	1.24		<i>SD</i>	0.51	
	<i>CV</i>	1.43%		<i>CV</i>	1.25%		<i>CV</i>	0.51%	
	Average extraction efficiency ratio ( <i>mean</i> )			100.3%					
	Standard deviation ( <i>SD</i> )			1.28					
	Coefficient of variation ( <i>CV</i> )			1.28%					

**Table 7.** Determination of determination (LOD) and quantification limits (LOQ) of the analytical method

Parameters	Signal values (peak area)	
		580
	441	424
	385	368
	503	394
	324	468
	450	360
	355	339
	492	459
	378	385
	389	348
Mean area, <i>n</i> = 20	413.5	
Standard deviation, <i>S</i>	64.5	
Coefficient of variation ( <i>CV</i> ), %	15.6	
Limit of detection (LOD), mg/ml	0.00001075	
Limit of quantitation (LOQ), mg/ml	0.00003584	

**Method validation**

Validation of this method was performed in accordance with PN-EN 482 standard requirements. The following validation parameters were determined for the HPLC-UV-VIS method:

- measurement range 0.0135.0–0.54 µg/ml (0.15–6.0 mg/m<sup>3</sup> for 180-litre air sample)

- limit of detection 0.011 µg/ml
- limit of quantitation 0.036 µg/ml
- correlation coefficient *r* = 0.9992
- expanded method uncertainty 21.3%.



## CONCLUSION

On the basis of the results of the study, a method for determining nitrilotriacetic acid (NTA) and its salts in air at workplaces was developed using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. The readings of the UV-VIS detector as a function of NTA concentration within the tested concentration range (0.0135–0.54 µg/ml) are linear. To keep dust or NTA aerosol or its salts out of the air, glass fibre filters should be used, which are then extracted using an NaOH solution (0.2 mol/l). The percentage NTA extraction efficiency from

filters amounts to 101.5. NTA samples collected on glass fibre filters stored in a refrigerator are stable for at least 14 days. The described method enables the determination of NTA in workplace air at concentrations from 0.15 mg/m<sup>3</sup>, i.e. from approx. 1/20 of the proposed TLV value. This method allows for the determination of NTA in the presence of other chelating agents that may be present in the tested air. The developed method for determining nitrilotriacetic acid and its salts in workplace air was recorded as an analytical procedure, as set out in the Appendix.

## PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES

- Bruchajzer E., Frydrych B., Szymańska J. (2020). Kwas nitylotriocetowy i jego sole – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [Nitrilotriacetic acid and its salts – inhalable fraction. Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)]. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 3(105), 37–95.
- Chiumiento F., D'Aloise A., Marchegiani F. et al. (2015). Determination of EDTA in feed and premix formulations by HPLC-DAD. *Food Chem.* 175, 452–456.
- Christison T., De Borja B., Rohrer J. (2016). Determination of chelating agents in drinking water and wastewater samples. Thermo Scientific, Application Note 268, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-268-IC-Chelating-Agents-Wastewater-Drinking-Water-AN71363-EN.pdf> [dostęp/cited: 2022].
- Crosbie G.A., Lodi A., McB Miller J.H. et al. (2003). The control of nitrilotriacetic acid in edetic acid and its salts by liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 435–440.
- Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy [Validation of methods for testing dust and chemical contaminants in the air at workplaces]. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 3(25), 5–14.
- ECHA, European Chemicals Agency (2022). <http://echa.europa.eu/pl/information-on-chemicals/ci-inventory-database/-/discli/details/94999> [dostęp/cited: 2022].
- Kemmei T., Kodama S., Yamamoto A. et al. (2007). Determination of sequestering agents in cosmetics and synthetic detergents by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1171, 63–68.
- Kemmei T., Kodama S., Yamamoto A. et al. (2013). Determination of ethylenediaminetetraacetic acid in foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 138(2–3), 866–869.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1999). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 73. Nitrilotriacetic acid and its salts. [In:] Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances, pp. 385–399, <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Chemicals-That-Cause-Tumours-Of-The-Kidney-Or-Urinary-Bladder-In-Rodents-And-Some-Other-Substances-1999> [dostęp/cited: 2022].
- Laine P., Matilainen R. (2005). Simultaneous determination of DTPA, EDTA, and NTA by UV-visible spectrometry and HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1601–1609.
- Narola B., Singh A.S., Mitra M. et al. (2011). A validated reverse phase HPLC method for the determination of disodium EDTA in meropenem drug substance with UV-detection using precolumn derivatization technique. *Anal. Chem. Insights* 6, 7–14.
- O'Hanlon J.A., Chapman R.D., Taylor F. et al. (2019). Quantification of common aminopolycarboxylic acids in trench leachate from the Low Level Waste Repository. *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 322, 1915–1929.
- PN-EN 482:2021-08 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężenia czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur [Workplace exposure – Procedures for the determination of the concentration of chemical agents – Basic performance requirements].
- PubChem (2022). National Library of Medicine. Nitrilotriacetic acid. Compound summary. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8758> [dostęp/cited: 2022].

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 packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006].

*Randt C., Wittlinger R., Merz W. (1993). Analysis of nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in water, particularly waste water. Fresenius J. Anal. Chem. 346, 728–731.*

*Wang G., Tomasella F.P. (2016). Ion-pairing HPLC methods to determine EDTA and DTPA in small molecule and biological pharmaceutical formulations. J. Pharm. Anal. 6(3), 150–156.*

## PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA KWASU NITRYLOTRIOCTOWEGO I JEGO SOLI W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

### 1. Zakres stosowania metody

W niniejszej procedurze analitycznej podano metodę oznaczania zawartości kwasu nitrylotrioctowego (numer CAS: 139-13-9) i jego soli disodowej (numer CAS: 15467-20-6) i trisodowej (numer CAS: 5064-31-3) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS). Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie kwasu nitrylotrioctowego, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi  $0,15 \text{ mg/m}^3$  (dla próbki powietrza o objętości 180 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 filtr z włókna szklanego obecnego w badanym powietrzu kwasu nitrylotrioctowego (lub jego soli), wymyciu osadzonego na filtrze związku roztworem NaOH o stężeniu  $0,2 \text{ mol/l}$  i przeprowadzeniu analizy chromatograficznej otrzymanego roztworu.

### 4. Wytyczne ogólne

#### 4.1. Dokładność ważenia

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

#### 4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

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

Pozostałe 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. Kwas nitrylotrioctowy

Stosować Certyfikowany Materiał Odniesienia (CRM).

#### 5.2. Woda destylowana

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

#### 5.3. Kwas siarkowy o ułamku masowym 95%

Stosować kwas siarkowy stężony o gęstości  $1,83 \text{ g/ml}$ .

#### 5.4. Roztwór kwasu siarkowego o stężeniu $5 \text{ mmol/l}$

Do kolby miarowej o pojemności  $1000 \text{ ml}$  wg punktu 6.7 zawierającej  $100 \text{ ml}$  wody wg punktu 5.2 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.6  $0,282 \text{ ml}$  kwasu siarkowego wg punktu 5.3. Kolbę uzupełnić do kreski wodą.

#### 5.5. Chlorek żelaza

Stosować chlorek żelaza sześciowodny ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ).

#### 5.6. Wodorotlenek sodu

Stosować wodorotlenek sodu.

### 5.7. Roztwór wodorotlenku sodu

Do zważonej 200-mililitrowej zlewki zawierającej 100 ml wody wg punktu 5.2 odważyć na wadze wg punktu 6.10 8 g wodorotlenku sodu wg punktu 5.6. Po dokładnym rozpuszczeniu się wodorotlenku sodu powstały roztwór przelać do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml wg punktu 6.7. Kolbę uzupełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi 0,2 mol/l.

### 5.8. Roztwór wzorcowy podstawowy kwasu nitrylotrioctowego

Do kolby pomiarowej o pojemności 5 ml wg punktu 6.7 odważyć na wadze analitycznej wg punktu 6.10 około 60 mg kwasu nitrylotrioctowego wg punktu 5.1. Do kolby dodać 3 ml roztworu wodorotlenku sodu wg punktu 5.7 i rozpuścić kwas nitrylotrioctowy za pomocą łaźni ultradźwiękowej wg punktu 6.12. Kolbę uzupełnić do kreski roztworem wodorotlenku sodu wg punktu 5.7 i dokładnie wymieszać. Obliczyć dokładną zawartość kwasu nitrylotrioctowego w 1 ml roztworu.

### 5.9. Roztwór wzorcowy pośredni kwasu nitrylotrioctowego

Do kolby pomiarowej o pojemności 5 ml wg punktu 6.7 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.6 taką ilość roztworu wzorca podstawowego kwasu nitrylotrioctowego wg punktu 5.8, aby stężenie w 1 ml roztworu wynosiło 10,8 mg.

### 5.10. Roztwory wzorcowe robocze kwasu nitrylotrioctowego

Do ośmiu kolb pomiarowych o pojemności 1 ml wg punktu 6.7 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.6 odpowiednio: 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 ml wzorca pośredniego kwasu nitrylotrioctowego wg punktu 5.9. Kolby uzupełnić do kreski roztworem wodorotlenku sodu wg punktu 5.7. Stężenia kwasu nitrylotrioctowego w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 0,27; 0,54; 1,08; 2,7; 5,4; 8,1 i 10,8 mg/ml.

Roztwory wg punktów: 5.8, 5.9 i 5.10 przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej 14 dni.

### 5.11. Roztwór fazy ruchomej

Na wadze analitycznej wg punktu 6.10 odważyć 27,02 mg chlorku żelaza wg punktu 5.5, przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml wg punktu 6.7, rozpuścić w roztworze kwasu siarkowego wg punktu 5.4. Stężenie chlorku żelaza w tak przygotowanym roztworze wynosi 100  $\mu$ mol/l.

## 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 oznaczanie kwasu nitrylotrioctowego w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna analityczna jonowymienna o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, wypełniona żelazem krzemionkowym modyfikowanym grupami propylowo-sulfonowymi o średnicy ziaren 5  $\mu$ m.

### 6.3. Pompa ssąca

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

### 6.4. Filtry z włókna szklanego

Filtry wykonane z włókna szklanego o średnicy 25 mm i średnicy porów 1,6  $\mu$ m.

### 6.5. Głowice do pobierania próbek powietrza

Głowice przeznaczone do pobierania frakcji wdychalnej.

### 6.6. Pipety do cieczy

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

### 6.7. Kolby pomiarowe

Kolby pomiarowe o pojemności: 1, 5 i 1000 ml.

### 6.8. Naczynka szklane

Naczynka szklane o pojemności 2 i 4 ml.

### 6.9. Filtry strzykawkowe

Filtry o średnicy 13 mm z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45  $\mu$ m.

### 6.10. Waga

Waga analityczna umożliwiająca ważenie z dokładnością do 0,0002 g.

### 6.11. Mieszadło rolkowe

Mieszadło hematologiczne rolkowe.

### 6.12. Łaźnia ultradźwiękowa

## 7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować wymagania zawarte w normie PN-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą PN-Z-04008-7:2002 /Az1:2004).

Próbki należy pobierać za pomocą zestawu do pobierania próbek powietrza składającego

się z pompy ssącej wg punktu 6.3 oraz filtra wykonanego z włókna szklanego o średnicy 25 mm umieszczonego w głowicy przeznaczonej do poboru frakcji wdychalnej. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej 14 dni.

## 8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać rozdzielenie kwasu nitrylotrioctowego od innych substancji występujących w badanym powietrzu.

W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.2 optymalne warunki wykonania oznaczania są następujące:

- faza ruchoma 0,1 mmol/l  $\text{FeCl}_3$   
w 5 mmol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- temperatura kolumny 30°C
- natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 1 ml/min
- długość fali analitycznej detektora UV-VIS 260 nm
- objętość dozowanej próbki 10  $\mu\text{l}$ .

## 9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na osiem filtrów wg punktu 6.4 nanieść za pomocą pipety do cieczy wg punktu 6.6 po 100  $\mu\text{l}$  roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 5.10. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek szklanych wg punktu 6.8, dodać po 2 ml roztworu wodorotlenku sodu wg punktu 5.5

i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła mechanicznego wg punktu 6.11. Ekstrakty przesączyć do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.6 za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.9. Zawartość kwasu nitrylotrioctowego w 1 ml roztworu wynosi odpowiednio: 0; 0,0135; 0,027; 0,0405; 0,135; 0,285; 0,405 i 0,54 mg/ml. Uzyskane ekstrakty poddać analizie chromatograficznej w warunkach podanych w rozdziale 8.

Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość kwasu nitrylotrioctowego naniesionego na filtr, a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni piku badanego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

## 10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek szklanych o pojemności 4 ml wg punktu 6.8. Dodać 2 ml roztworu wodorotlenku sodu wg punktu 5.6. Naczynka szczelnie zamknąć i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła mechanicznego wg punktu 6.11. Ekstrakty przesączyć do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.6 za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.9 i poddać analizie chromatograficznej.

## 11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie kwasu nitrylotrioctowego ( $X$ ) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

- $m$  – masa kwasu nitrylotrioctowego odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,
- $V$  – objętość powietrza przepuszczonego, w metrach sześciennych.





## ANALYTICAL PROCEDURE FOR DETERMINING NITRILOTRIACETIC ACID AND ITS SALTS IN WORKPLACE AIR USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

### 1. Scope of the method

This is the analytical procedure for determining nitrilotriacetic acid (CAS: 139-13-9) and its disodium (CAS: 15467-20-6) and trisodium salt (CAS: 5064-31-3) in workplace air using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (UV-VIS). The method is used during the inspection of sanitary and hygiene conditions.

The lowest concentration of nitrilotriacetic acid that can be determined under the air sampling and determination conditions described in the procedure is 0.15 mg/m<sup>3</sup> (for a 180-litre air sample).

### 2. Normative references

In order to use this document, the documents listed below, which have been normatively referred to in whole or in part, are required. For dated references, only the cited issue applies. For undated references, the last issue of the listed document (as amended) should be used.

PN-Z-04008-7 Air purity protection – Sampling – Rules for sampling air in the working environment and interpretation of the results.

### 3. Method principle

The method consists in passing nitrilotriacetic acid (or its salts) present in the tested air through a glass fibre filter, washing the compound deposited on the filter with 0.2 mol/litre NaOH solution and performing chromatographic analysis of the obtained solution.

### 4. General guidelines

#### 4.1. Weighing accuracy

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

#### 4.2. Handling of hazardous substances

Operations involving the use of organic solvents should be carried out with personal protective equipment under a well-functioning laboratory fume hood.

After analysis, solutions of reagents and standards should be collected in specially designated containers and transferred for disposal to authorised institutions.

### 5. Reagents, solutions and materials

During the analysis, if there are no other requirements, at least analytically pure substances should be used.

#### 5.1. Nitrilotriacetic acid

Use the Certified Reference Material (CRM).

#### 5.2. Distilled water

Use HPLC-grade distilled water, hereinafter called water.

#### 5.3. 95% sulphuric acid

Use sulphuric acid concentrated with the density of 1.83 g/ml.

#### 5.4. 5 mmol/l sulphuric acid solution

Transfer 0.282 ml of sulphuric acid as per Section 5.3 using a pipette as per Section 6.6 into a 1000 ml volumetric flask as per Section 6.7, containing 100 ml of water as described in Section 5.2. Fill the flask with water to the mark.

#### 5.5. Iron chloride

Use iron chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O).

#### 5.6. Sodium hydroxide

Use sodium hydroxide.

#### 5.7. Sodium hydroxide solution

Weigh 8 g of NaOH as per Section 5.6 on a balance as per Section 6.10 into a weighed 200 ml beaker containing 100 ml of water as described in Section 5.2. After thorough dissolution of the sodium hydroxide, transfer the obtained solution into a 1000 ml volumetric flask as described in Section 6.7. Fill the flask with water to the mark. The concentration of the solution prepared in this way is 0.2 mol/l.

### 5.8 Nitritotriacetic acid primary calibration solution

Weigh ca. 60 mg of nitritotriacetic acid as per Section 5.1 on an analytical balance as per Section 6.10 into a 5 ml volumetric flask as per Section 6.7. Add 3 ml of sodium hydroxide solution as per Section 5.7 to the flask and dissolve nitritotriacetic acid with ultrasonic cleaner as described in Section 6.12. Fill the flask with sodium hydroxide solution to the mark as per Section 5.7 and mix thoroughly. Calculate the exact content of nitritotriacetic acid in 1 ml of the solution.

### 5.9 Nitritotriacetic acid intermediate calibration solution

Measure in a 5 ml volumetric flask as per Section 6.7 with a pipette as described in Section 6.6 such a quantity of nitritotriacetic acid primary calibration solution as per Section 5.8, so that the concentration in 1 ml of the solution is 10.8 mg.

### 5.10 Nitritotriacetic acid working calibration solutions

Measure the following amounts of intermediate calibration solution of nitritotriacetic acid as per Section 5.9 into eight 1 ml measuring flasks as per Section 6.7 with a pipette as per Section 6.6: 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 ml. Fill the flasks with sodium hydroxide solution to the mark as per Section 5.7. Concentrations of nitritotriacetic acid in solutions prepared this way are as follows: 0, 0.27, 0.54, 1.08, 2.7, 5.4, 8.1 and 10.8 mg/ml.

Solutions as per the following Sections: 5.8, 5.9 and 5.10 stored in the refrigerator remain stable for at least 14 days.

### 5.11. Mobile phase

Weigh 27.02 mg of iron chloride as per Section 5.5 on an analytical balance as per Section 6.10, transfer it to a 1000 ml volumetric flask as per Section 6.7, dissolve in sulphuric acid solution as per Section 5.4. The concentration of iron chloride in solution prepared this way is 100 µmol/l.

## 6. Measuring instruments and auxiliary equipment

Use typical laboratory equipment and the following:

### 6.1. Liquid chromatograph

Liquid chromatograph with a spectrophotometric detector.

### 6.2. Chromatographic column

Chromatographic column allowing for determination of nitritotriacetic acid in the presence of other substances simultaneously occurring in the tested air, e.g. a ion-exchange column filled with silica gel modified with propyl-sulphonic groups with a grain size of 5 µm, length of 250 mm and internal diameter of 4.6 mm.

### 6.3. Suction pump

Suction pump for air intake with a constant volumetric flow rate as per Chapter 7.

### 6.4. Glass fibre filters

Glass fibre filters with a diameter of 25 mm and a pore diameter of 1.6 µm.

### 6.5. Air sampling heads

Breathable fraction sampling heads.

### 6.6. Liquid pipettes

0.010–0.1 ml, 0.1–1 ml and 0.5–5 ml automatic adjustable pipettes.

### 6.7. Volumetric flasks

Volumetric flasks of: 1, 5 and 1000 ml.

### 6.8. Glass vessels

2 and 4 ml glass vessels.

### 6.9. Syringe filters

Use 13 mm diameter filters with a PTFE membrane with 0.45 µm pore diameter.

### 6.10. Balance

An analytical balance to weigh with an accuracy of 0.0002 g.

### 6.11. Tube roller

Haematology tube roller.

### 6.12. Ultrasonic cleaner

## 7. Collection of air samples

During air sampling, the requirements laid down in standard PN-Z-04008-7:2002 (with subsequent amendment PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004) should be followed.

Using an air sampling kit consisting of a suction pump as per Section 6.3 and a glass fibre filter with a diameter of 25 mm placed in the breathable fraction collection head. Secure the collected air samples and store them in the refrigerator until analysis.

If stored in a refrigerator, the samples collected should remain stable for at least 14 days.

## 8. Chromatograph operating conditions

The chromatograph operating conditions should be selected so as to obtain separation of

nitilotriacetic acid from other substances present in the air under test.

If a column with the parameters specified in Section 6.2. is used, the optimum determination conditions are as follows:

- mobile phase 0.1 mmol/l FeCl<sub>3</sub>  
in 5 mmol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- column
- temperature 30°C
- mobile phase
- flow rate 1 ml/min
- UV-VIS detector
- wavelength 260 nm
- dispensed sample
- volume 10 µl.

### 9. Drawing up a calibration curve

Apply 100 µl of working calibration solutions as per Section 5.10 to each of 8 filters as described in Section 6.4 using a liquid pipette as per Section 6.6. After the solvent has evaporated, transfer the filters to a glass vessel as per Section 6.8, add 2 ml of sodium hydroxide solution as per Section 5.5 and extract for 30 minutes with a mechanical stirrer as described in Section 6.11. Filter the extracts into a 2 ml vessel as described in Section 6.6 using syringe filters as per Section 6.9. The content of nitilotriacetic acid in 1 ml of the solution is: 0, 0.0135, 0.027, 0.0405, 0.135, 0.285, 0.405 and 0.54 mg/ml. The extracts should be analysed chromatographically under the conditions specified in Section 8.

Plot a calibration curve with the amount of nitilotriacetic acid on the X axis and the peak area of the tested compound on the Y axis. Automatic data integration and calibration curve plotting is allowed.

### 10. Determination

After air sampling, transfer the filters to 4 ml glass vessels as per Section 6.8. Add 2 ml of sodium hydroxide solution as described in Section 5.6. Close the vessels tightly and extract for 30 minutes with a mechanical stirrer as per Section 6.11. Filter the extracts into 2 ml vessels as per Section 6.6 using syringe filters as per Section 6.9 and analyse chromatographically.

### 11. Calculation of the determination result

Calculate the concentration of nitilotriacetic acid (*X*) in the tested air in milligrams per cubic meter using the following formula:

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

where:

- m* – mass of nitilotriacetic acid read from the calibration curve, in micrograms;
- V* – volume of air passed through, in cubic meters.

#### Adres do korespondencji/Contact details:

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI  
e-mail: slawomir.brzezniccki@imp.lodz.pl  
Instytut Medycyny Pracy  
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera  
91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8  
POLAND

