

## 2-Nitroanizol

### Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy<sup>1</sup>

#### 2-Nitroanisole

#### Determining in workplace air with gas chromatography

dr inż. ANNA JEŻEWSKA

<https://orcid.org/0000-0002-8765-4079>

inż. AGNIESZKA WOŹNICA

<https://orcid.org/0000-0001-5335-5970>

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Central Institute for Labour Protection – National Research Institute

Numer CAS            91-23-6

---

---

#### Streszczenie

2-Nitroanizol to bezbarwna lub lekko żółta ciecz. Substancja ta jest wykorzystywana głównie do produkcji *o*-anizydyny (2-metoksyaniliny), która jest stosowana bezpośrednio lub pośrednio do produkcji ponad 100 barwników azowych. 2-Nitroanizol może powodować raka u ludzi.

Celem pracy było opracowanie metody oznaczania 2-nitroanizolu, która umożliwi oznaczanie jego stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy, w zakresie od 1/10 do 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS).

Opracowana metoda polega na: adsorpcji 2-nitroanizolu na żelu krzemionkowym, ekstrakcji metanolem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu. Badania wykonano z zastosowaniem chromatografu ciekłego (HPLC) serii 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem diodowym (DAD). Oznaczenia prowadzono z zastosowaniem kolumny Ultra C18 (25 cm × 4,6 mm, o uziarnieniu 5 µm). Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Metoda umożliwia oznaczanie 2-nitroanizolu w powietrzu środowiska pracy w zakresie stężeń 0,16 ÷ 3,2 mg/m<sup>3</sup>, tj. od 1/10 do 2 wartości NDS. W podanym zakresie uzyskana krzywa kalibracji miała przebieg liniowy, o czym świadczy współczynnik regresji na poziomie 1. Całkowita precyzja badania wyniosła około 5,3%, a niepewność rozszerzona metody 23%.

Opisywana metoda analityczna umożliwia selektywne oznaczanie 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy, w obecności takich substancji współwystępujących, jak: metanol, *o*-anizydyna, 3-nitroanizol, 4-nitroanizol i 1-chloro-2-nitrobenzen.

Metoda oznaczania 2-nitroanizolu została przedstawiona w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

---

<sup>1</sup> Publikacja opracowana na podstawie wyników IV etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie zadań służb państwowych przez Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

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

**Słowa kluczowe:** 2-nitroanizol, substancja rakotwórcza, metoda analityczna, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

## Abstract

2-Nitroanisole is a colourless or slightly yellowish liquid. This substance is mainly used in the production of *o*-anisidine (2-methoxyaniline), which is directly or indirectly used for the production of more than 100 azo dyes. 2-Nitroanisole may cause cancer to humans. The aim of this study was to develop a method for determining concentrations of 2-nitroanisole in workplace air in the range from 1/10 to 2 of maximum admissible concentration (MAC) values. The developed method is based on the adsorption of 2-nitroanisole on a silica gel, extraction with methanol and chromatographic analysis of the resulting solution. The tests were performed using a liquid chromatograph (HPLC) 1200 series of Agilent Technologies with a diode array detector (DAD). Determinations were performed using an Ultra C18 column (25 cm × 4.6 mm, dp = 5 µm). The procedure was validated according to Standard No. EN 482. The method can be used to determine 2-nitroanisole in workplace air in the concentration range from 0.16 to 3.2 mg/m<sup>3</sup>, i.e., from 1/10 to 2 MAC values. In that range, the obtained calibration curve was linear, as evidenced by the regression coefficient of 1. The overall accuracy of the method was about 5.3% and its relative total uncertainty was 23%. This method enables selective determination of 2-nitroanisole in workplace air in the presence of other compounds, such as methanol, *o*-anisidine, 3-nitroanisole, 4-nitroanisole and 1-chloro-2-nitrobenzene. The method for determining 2-nitroanisole has been recorded in the form of 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:** 2-nitroanisole, carcinogens, determination method, workplace air, health sciences, environmental engineering.

## WPROWADZENIE

2-Nitroanizol to bezbarwna lub lekko żółta ciecz, słabo rozpuszczalna w wodzie. Dobrze rozpuszcza się w tetrachlorku węgla oraz miesza się z etanolem i eterem dietylowym (Lewis 2007). Masa molowa 2-nitroanizolu wynosi 153,1 g/mol, a jego temperatury wynoszą odpowiednio: wrzenia 273 ÷ 277 °C, topnienia 10,5 °C, zapłonu 142 °C i samozapłonu 464 °C. Prężność par 2-nitroanizolu w 20 °C wynosi 6 Pa (GESTIS 2019; IARC 1982).

2-Nitroanizol nie występuje naturalnie w środowisku, jest produkowany z 1-chloro-2-nitrobenzenu w obecności metanolu i wodorotlenku sodu (Lewis 2007). Obecnie 2-nitroanizol produkowany jest głównie w Chinach i w Indiach. Przeważająca ilość tej substancji jest zużywana do produkcji *o*-anizydyny (2-metoksyaniliny), która jest stosowana bezpośrednio lub pośrednio do produkcji ponad 100 barwników azowych. 2-Nitroanizol może być stosowany także do produkcji farmaceutyków. 2-Nitroanizol występuje w dymie papierosowym (IARC 1982; 1996).

2-Nitroanizol jest substancją rakotwórczą (IARC 1996; Stiborová i in. 2004; Stiborová i in. 2009). Substancja ta powoduje zahamowanie funkcji hemoglobiny krwi (methemoglobinemię). W wyniku zatrucia ostrego jej pary mogą spowodować: zasinienie warg, paznokci i skóry, zawroty głowy, ból głowy, nudności i dezorientację. W wyniku zatrucia przewlekłego substancja powoduje wysuszenie lub pękanie skóry oraz niedokrwistość (ICSC 2004). Ze względu na zagrożenia dla zdrowia ludzi 2-nitroanizol został sklasyfikowany w rozporządzeniu Komisji (UE) 2018/669 jako substancja: rakotwórcza (Carc. 1B) i wykazująca toksyczność ostrą (Acute Tox. 4), (Rozporządzenie... 2018). Substancji tej przypisano następujące zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia:

- H350: może powodować raka,
- H302: działa szkodliwie po połknięciu.

W 2016 r. do Centralnego Rejestru Danych o Narażeniu na Substancje Chemiczne, ich Mieszaniny, Czynniki lub Procesy Technologiczne o Działaniu

Rakotwórczym lub Mutagennym, prowadzonego w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi, zgłoszono 206 osób narażonych na działanie 2-nitroanizolu.

W 2017 r. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych i Pyłowych, działający przy Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy, zaproponował wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla 2-nitroanizolu na poziomie  $1,6 \text{ mg/m}^3$ . Międzyresortowa Komisja przyjęła i przedłożyła ministrowi właściwemu ds. pracy wniosek w sprawie wprowadzenia do wykazu wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń (do załącznika nr 1 Rozporządzenia Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12.06.2018 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia

w środowisku pracy) wartości NDS dla tej substancji (Koradecka, Skowroń 2019; Starek 2019).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono metod oznaczania 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy, a jedynie informację, że w próbkach środowiskowych może być analizowany z zastosowaniem chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów (Mitchell, Deveraux 1978).

Celem pracy było opracowanie czułej i selektywnej metody umożliwiającej oznaczanie stężeń 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy, w zakresie od  $1/10$  do 2 wartości NDS, tj.  $0,16 \div 3,2 \text{ mg/m}^3$ .

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

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Aparatura

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

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

Do przeprowadzenia ekstrakcji analitów z sorbentów (żelu krzemionkowego, żywicy XAD-2 i żywicy XAD-4) korzystano z wytrząsarki mechanicznej WL-2000 (JWElectronic, Polska). Wzorce odważano na wadze analitycznej Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA). Próbki przechowy-

wano w eksykatorze szafkowym serii EKS (WSL, Polska) i w chłodziarce ARDO CO23B-2H (Merloni, Polska).

### Odczynniki i materiały

W badaniach stosowano następujące odczynniki o czystości co najmniej cz.d.a.: 2-nitroanizol, 3-nitroanizol, 4-nitroanizol, 1-chloro-2-nitrobenzen, *o*-anizydyna (Sigma-Aldrich, Niemcy), metanol (Merck, Niemcy).

Stosowano także wodę o wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA).

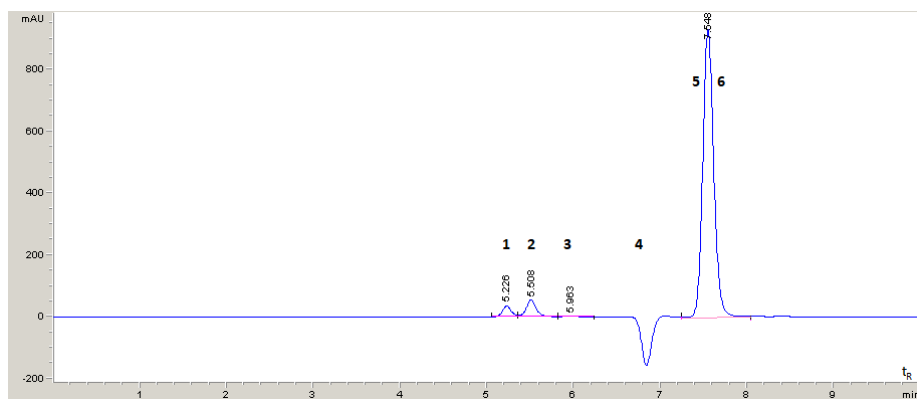
Ponadto stosowano: rurki szklane wypełnione żelem krzemionkowym (200/100 mg i 100/50 mg), (Zakład Usługowo Produkcyjny „Analityk”, Polska), żywicą XAD-2 (100/50 mg) nr kat. 20258 (Supelco, USA), żywicą XAD-4 (80/40 mg) nr kat. 226-93 (SKC, USA), szkło laboratoryjne oraz strzykawki do cieczy.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

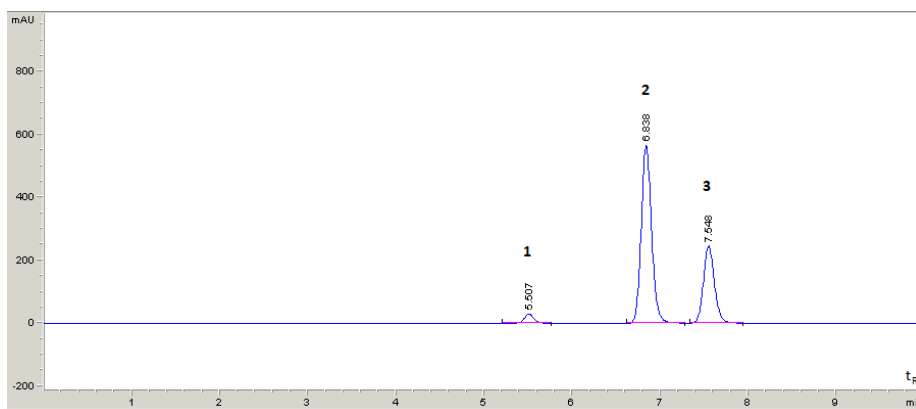
## Ustalenie warunków oznaczania chromatograficznego

W wyniku badań wstępnych zdecydowano się oznaczać 2-nitroanizol z zastosowaniem chromatografu cieczowego z detektorem diodowym (DAD). Ustalono następujące warunki oznaczania chromatograficznego dla tej substancji: kolumna Ultra C18 w temperaturze 23 °C, faza ruchoma (metanol: woda) w stosunku objętościowym 80:20 (v/v), natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min, dozowanie próbki 10 µl, ustalone długości fali analitycznej detektora DAD to:  $\lambda = 262$  nm lub  $\lambda = 328$  nm. Na podstawie analizy widma 2-nitroanizolu w zakre-

sie 190 ÷ 690 nm wykazano, że w przedstawionych warunkach 2-nitroanizol absorbuje promieniowanie UV przy długości fali analitycznej  $\lambda = 212$ ; 262 oraz 328 nm. Ze względu na to, że większość interferencji pochodzących od substancji mogących współwystępować z 2-nitroanizolem w badanym powietrzu absorbuje promieniowanie UV przy długości fali analitycznej 200 ÷ 220 nm, dalsze badania prowadzono przy długości fali analitycznej  $\lambda = 262$  i 328 nm. Sprawdzone, że 2-nitroanizol może być oznaczany w ustalonych warunkach, w obecności: metanolu, 3-nitroanizolu, 4-nitroanizolu, 1-chloro-2-nitrobenzenu i *o*-anizydyny (rys. 1. i 2.).



**Rys. 1.** Chromatogram roztworu wzorcowego 2-nitroanizolu w obecności substancji współwystępujących: metanolu, *o*-anizydyny, 4-nitroanizolu, 3-nitroanizolu i 1-chloro-2-nitrobenzenu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262$  nm. Legenda: 1) *o*-anizydyna, 2) 2-nitroanizol, 3) zanieczyszczenie, 4) 4-nitroanizol, 5) 3-nitroanizol i 1-chloro-2-nitrobenzen



**Rys. 2.** Chromatogram roztworu wzorcowego 2-nitroanizolu w obecności substancji współwystępujących: metanolu, *o*-anizydyny, 4-nitroanizolu, 3-nitroanizolu i 1-chloro-2-nitrobenzenu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 328$  nm. Legenda: 1) 2-nitroanizol, 2) 4-nitroanizol, 3) 3-nitroanizol i 1-chloro-2-nitrobenzen

## Ustalenie warunków pobierania próbek powietrza

Do pobierania próbek powietrza wytypowano trzy różne sorbenty: żel krzemionkowy, żywicę XAD-2 oraz żywicę XAD-4 i przeprowadzono badania, które miały na celu wybór najlepszego sorbentu. Do desorpcji stosowano 1 ml metanolu. Wyniki uzyskane po analizie roztworów porównawczych i po desorpcji umożliwiły wyliczenie średnich współczynników desorpcji, które dla żywicy XAD-2 i XAD-4 wynosiły: 0,72, a dla żelu krzemionkowego 0,97. Do dalszych badań wytypowano żel krzemionkowy jako sorbent i metanol jako desorbent 2-nitroanizolu z żelu krzemionkowego.

Badania adsorpcji 2-nitroanizolu z powietrza przeprowadzono z zastosowaniem dwóch rodzajów rurek sorpcyjnych wypełnionych żelem krzemionkowym w ilości 200/100 mg oraz 100/50 mg. W celu sprawdzenia możliwości pobierania próbek powietrza metodą dozymetrii indywidualnej przeprowadzono badania adsorpcji 2-nitroanizolu (o stężeniu odpowiadającym około 5 NDS) na żelu krzemionkowym. Przez rurki przepuszczano 18 l powietrza ze stałym strumieniem objętości: 9; 6 i 3 l/h. Roztwory uzyskane po desorpcji metanolem (1 ml) z pierwszej i drugiej warstwy żelu krzemionkowego oznaczano chromatograficznie w warunkach opisanych wyżej. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Badania adsorpcji 2-nitroanizolu na żelu krzemionkowym. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262$  nm

Rodzaj próbника	Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h	Czas pochłaniania, h	Przybliżone stężenie substancji w powietrzu, mg/m <sup>3</sup>	Powierzchnia pików 2-nitroanizolu w roztworach po desorpcji	
				I warstwa	II warstwa
Rurka z żelem krzemionkowym 200/100 mg	9	2	8	2 860,9	brak pików
	6	3	8	2 237,8	brak pików
	3	6	8	1 657,3	brak pików
Rurka z żelem krzemionkowym 100/50 mg	9	2	8	2 027,4	brak pików
	6	3	8	1 847,1	brak pików
	3	6	8	1 824,6	brak pików

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że 2-nitroanizol zatrzymuje się całkowicie na pierwszej warstwie żelu, bez względu na ilość żelu (200 czy 100 mg) w rurce pochłaniającej, dlatego do dalszych badań stosowano rurki szklane wypełnione dwiema warstwami żelu krzemionkowego 100/50 mg.

## Badanie stopnia desorpcji

Badanie stopnia desorpcji 2-nitroanizolu z żelu przeprowadzono w następujący sposób: do sześciu rurek adsorpcyjnych, na włókno szklane umieszczone przed 100-miligramową warstwą żelu krzemionkowego, nanoszono w trakcie pobierania próbek powietrza po 6  $\mu$ l roztworu 2-nitroanizolu w metanolu o stężeniu 0,47 mg/ml, co odpowiadało 2,8  $\mu$ g 2-nitroanizolu. Do kolejnych sześciu rurek pochłaniających dodano po 5 i 10  $\mu$ l (razem 12 rurek) roztworu

2-nitroanizolu w metanolu o stężeniu 6 mg/ml, co odpowiadało 30 i 60  $\mu$ g 2-nitroanizolu. Przez rurki przepuszczano 18 litrów powietrza ze strumieniem objętości 3 l/h. Następnie przeprowadzono desorpcję 2-nitroanizolu metanolem (1 ml). Po 30-minutowym wytrząsaniu uzyskane roztwory oznaczano chromatograficznie. W drugiej, zabezpieczającej warstwie żelu nie stwierdzono obecności badanej substancji. Wykonano także oznaczanie 2-nitroanizolu w roztworach porównawczych przygotowanych w identyczny sposób, ale bez żelu krzemionkowego.

Po odczytaniu powierzchni pików z chromatogramów roztworów po desorpcji i roztworów porównawczych obliczono współczynniki desorpcji. Średni współczynnik desorpcji dla trzech poziomów stężeń wynosi 0,99. Wyniki przedstawiono w tabelach 2. i 3.

Tabela 2.

Badania stopnia desorpcji 2-nitroanizolu z żelu krzemionkowego. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262$  nm

Masa 2-nitroanizolu naniesiona na żel, $\mu\text{g}$	Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych	Średni współczynnik desorpcji
2,8	41,1	41	1,01
30	397,9	401,25	0,99
60	789,7	807,4	0,98

Tabela 3.

Badania stopnia desorpcji 2-nitroanizolu z żelu krzemionkowego. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 328$  nm

Masa 2-nitroanizolu naniesiona na żel, $\mu\text{g}$	Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych	Średni współczynnik desorpcji
2,8	24,2	23,7	1,02
30	224,6	233,65	0,96
60	456,4	456,7	0,98

Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że rurka pochłaniająca zawierająca dwie sekcje żelu krzemionkowego zapewnia ilościowe wyodrębnienie 2-nitroanizolu z powietrza, a metanol jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do desorpcji 2-nitroanizolu z żelu krzemionkowego.

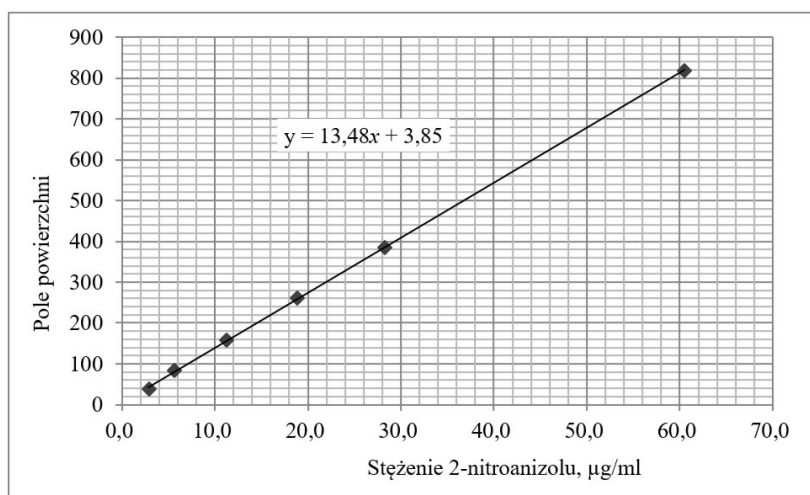
### Kalibracja i precyzja

Oznaczanie kalibracyjne wykonywano dla roztworów 2-nitroanizolu w metanolu. Zakres stężeń roztworów wzorcowych wynosi  $2,84 \div 60,48 \mu\text{g/ml}$ . Do oznaczeń kalibracyjnych przygotowano po trzy serie roztworów, które poddano analizie chromatograficznej w warunkach omówionych wcześniej. Wykresy zależności powierzchni pików 2-nitroanizolu od jego stężeń w roztworach wzorcowych, uzyskane przy długości fali analitycznej detektora DAD,  $\lambda = 262$  nm, przedstawiono na rys. 3., a przy długości fali analitycznej detektora DAD,  $\lambda = 328$  nm, na rys. 4. Współczynnik nachylenia „b” krzywej kalibracji (rys. 3.) o równaniu  $y = bx + a$ , charakteryzujący czułość metody, wynosi 13,48. Liniowość krzywej wzorcowej charakteryzowana jest wartością współczyn-

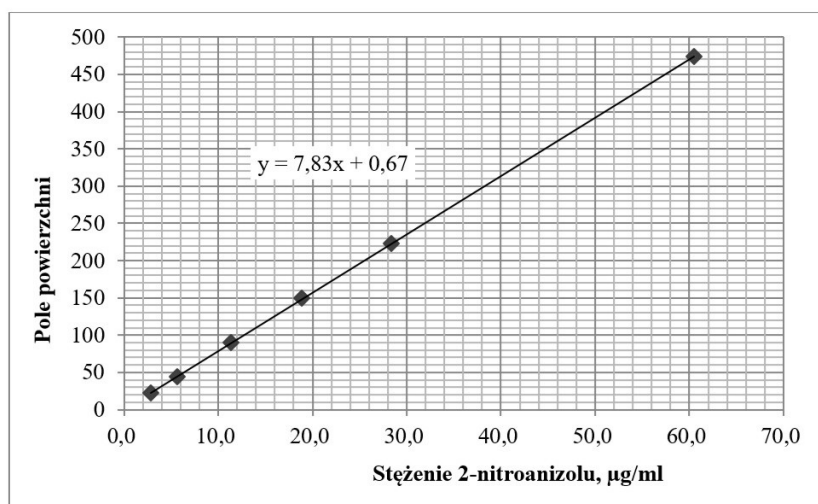
nika korelacji. Współczynnik korelacji „r” wynosi 1.

Współczynnik nachylenia „b” krzywej kalibracji przy długości fali analitycznej  $\lambda = 328$  nm (rys. 4.) o równaniu  $y = bx + a$  wynosi 7,83, a współczynnik korelacji „r” wynosi 1.

W celu oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych przygotowano trzy serie po osiem roztworów roboczych 2-nitroanizolu w metanolu o stężeniach: 1,8; 18 i 36  $\mu\text{g/ml}$ . Wykonano pomiary chromatograficzne po dwa z każdego roztworu w identycznych warunkach jak przy wykonaniu oznaczeń kalibracyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Wartości charakteryzujące precyzję oznaczeń kalibracyjnych zestawiono w tabeli 4. Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężenia wynoszą odpowiednio: 2,54; 1,75 i 1,49%.



**Rys. 3.** Wykres zależności powierzchni pików od stężenia 2-nitroanizolu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262$  nm



**Rys. 4.** Wykres zależności powierzchni pików od stężenia 2-nitroanizolu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 328$  nm

**Tabela 4.**

Precyzja oznaczeń kalibracyjnych 2-nitroanizolu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262$  nm i  $\lambda = 328$  nm

Długość fali analitycznej detektora DAD	$\lambda = 262$ nm			$\lambda = 328$ nm		
	I	II	III	I	II	III
Seria pomiarów ( $n = 8$ )						
Stężenie roztworu, µg/ml	2,8	30	60	2,8	30	60
Średnia powierzchni piku	38,34	394,28	805,68	22,08	229,89	468,32
Odchylenie standardowe	0,87	4,18	10,25	0,48	2,23	6,06
Współczynnik zmienności, %	2,27	1,06	1,27	2,17	0,97	1,29
Średnia precyzja – średni współczynnik zmienności dla zakresu pomiarowego, %	1,62			1,56		

## Badanie trwałości próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza badano po jednym dniu oraz po: czterech, sześciu i ośmiu dniach przechowywania ich w chłodziarce i w eksykatorze. Wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że próbki zachowują trwałość przez 8 dni bez względu na sposób ich przechowywania.

Tabela 4.

Trwałość próbek przechowywanych w chłodziarce i eksykatorze. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 23 °C, detektor DAD,  $\lambda = 262 \text{ nm}$

Numer rurki	Czas przechowywania, liczba dni	Średnie pola powierzchni pików	Średnie pole powierzchni uzyskane z dwóch rurek	Średnie pola powierzchni pików	
				eksykator	chłodziarka
1	1	229,50	229,05	228,20	227,95
2		228,60		227,70	
1	4	233,70	233,85	224,20	223,45
2		234,00		222,70	
1	4	228,20	227,30	237,20	237,10
2		226,40		237,00	
1	6	234,00	233,55	226,70	226,55
2		233,10		226,40	
1	8	227,80	227,90	223,80	222,25
2		228,00		220,70	
1	8	229,50	229,05	235,70	235,20
2		228,60		234,70	

## Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono według wytycznych zawartych w normie PN-EN 482. Granicę wykrywalności i granicę oznaczalności wyznaczono na podstawie wyników analiz 3 niezależnie przygotowanych ślepych prób (z 10 niezależnych pomiarów

powierzchni pików o czasie retencji 2-nitroanizolu dla każdej ze ślepych prób). Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5.

Parametry walidacyjne metody oznaczania 2-nitroanizolu

Parametr	Wartość	
	$\lambda = 262 \text{ nm}$	$\lambda = 328 \text{ nm}$
Długość fali analitycznej detektora DAD	$\lambda = 262 \text{ nm}$	$\lambda = 328 \text{ nm}$
Zakres pomiarowy	0,16 ÷ 3,2 mg/m <sup>3</sup>	
Ilość pobranego powietrza	18 l	
Zakres krzywej wzorcowej	2,84 ÷ 60 µg/ml	
Granica wykrywalności	4,55 ng/ml (0,25 µg/m <sup>3</sup> )	5,27 ng/ml (0,29 µg/m <sup>3</sup> )
Granica oznaczalności	13,66 ng/ml (0,76 µg/m <sup>3</sup> )	15,8 ng/ml (0,88 µg/m <sup>3</sup> )
Całkowita precyzja badania	5,26%	5,24%
Względna niepewność całkowita	12%	11%
Niepewność rozszerzona	23%	23%



## PODSUMOWANIE

W artykule przedstawiono metodę oznaczania 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metoda polega na: adsorpcji obecnego w powietrzu 2-nitroanizolu na żelu krzemionkowym, desorpcji metanolem i chromatograficznym oznaczaniu tak uzyskanego roztworu. Warunki oznaczania chromatograficznego dobrano tak, aby umożliwić oznaczanie 2-nitroanizolu w obecności: metanolu, *o*-anizydyny, 3-nitroanizolu, 4-nitroanizolu i 1-chloro-2-nitrobenzenu – substancji, które mogą współwystępować w środowisku pracy.

Metoda umożliwia oznaczanie 2-nitroanizolu w zakresie stężeń  $0,16 \div 3,2 \text{ mg/m}^3$ , tj. od 1/10 do 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia. W tym zakresie stężeń metoda została poddana walidacji przy dwóch długościach fali analitycznej detektora DAD:  $\lambda = 262 \text{ nm}$  i  $\lambda = 328 \text{ nm}$ . Wyznaczono takie parametry walidacyjne, jak: granica wykrywalności, granica oznaczalności, całkowita precyzja badania, względna niepewność całkowita i niepewność rozszerzona. Uzyskane parametry walidacyjne potwierdzają przydatność metody do oznaczania 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- GESTIS (2019). 2-Nitroanisole. GESTIS Substance database. Germany, Sankt Augustin, BG Institute for Occupational Safety and Health.
- IARC (1982). Ortho- and para-anisidine and their hydrochlorides. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals in Humans 27, 63–80.
- IARC (1996). Printing Processes and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 65, 369–380.
- ICSC (2004). International Chemical Safety Cards. ICSC: 1520. 2-Nitroanisole. The International Programme on Chemical Safety and the European Commission. IPCS INCHEM.
- Koradecka D., Skowroń J. (2019). Sprawozdanie z działalności Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy w 2018 r. oraz plan pracy w 2019 r. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 1(99), 107–126.
- Lewis R.J. (2007). 2-Nitroanisole. [In:] Hawley's Condensed Chemical Dictionary 15<sup>th</sup> Edition. New York, NY, John Wiley & Sons Inc., 893.
- Mitchell J., Deveraux H.D. (1978). Determination of traces of organic compounds in the atmosphere: role of detectors in gas chromatography. Analytica Chimica Acta 100, 45–52.
- Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/669 z dnia 16 kwietnia 2018 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu naukowo-technicznego, rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin. Dz. Urz. UE z dnia 4.05.2018 r. (L 115/1) [Commission Regulation (EU) 2018/669 of 16 April 2018 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures].
- Starek A. (2019). 2-Nitroanizol. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [2-Nitroanisole. Documentation of occupational exposure limits (OELs)]. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment] 2(100), 83–99.
- Stiborová M., Miksanová M., Smrček S., Bieler C.A., Breuer A., Klokow K.A., Schmeiser H.H., Frei E. (2004). Identification of a genotoxic mechanism for 2-nitroanisole carcinogenicity and of its carcinogenic potential for humans. Carcinogenesis 25(5), 833–840.
- Stiborová M., Naiman K., Martínková M., Martínek V., Svobodová M., Schmeiser H.H., Frei E. (2009). Genotoxic mechanisms for the carcinogenicity of the environmental pollutants and carcinogens *o*-anisidine and 2-nitroanisole follow from adducts generated by their metabolite N-(2-methoxyphenyl)-hydroxylamine with deoxyguanosine in DNA. Interdiscip Toxicol. 2(1), 24–27.



## PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA 2-NITROANIZOLU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

### 1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania 2-nitroanizolu w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie 2-nitroanizolu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi  $0,16 \text{ mg/m}^3$  (dla próbki powietrza o objętości 18 l).

### 2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

### 3. Zasada metody

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w badanym powietrzu 2-nitroanizolu na żelu krzemionkowym, desorpcji metanolem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

### 4. Wytyczne ogólne

#### 4.1. Dokładność ważenia

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

4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi  
Czynności, podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać z użyciem środków ochrony indywidualnej, pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Pozostałe po analizie roztwory odczynników i wzorców należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji w uprawnionych instytucjach.

### 5. Odczynniki, roztwory i materiały

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

Do przygotowania wszystkich roztworów należy stosować wodę destylowaną o czystości do HPLC.

#### 5.1. 2-Nitroanizol

#### 5.2. Metanol, o czystości do HPLC

#### 5.3. Roztwór wzorcowy podstawowy 2-nitroanizolu

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 10 ml odważyć około  $14,4 \text{ mg}$  2-nitroanizolu, uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.2. i dokładnie wymieszać. Stężenie 2-nitroanizolu w tak przygotowanym roztworze wynosi około  $1,44 \text{ mg/ml}$ .

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość przez co najmniej 7 dni.

#### 5.4. Roztwory wzorcowe robocze 2-nitroanizolu

Do sześciu kolb pomiarowych o pojemności 5 ml odmierzyć takie ilości roztworu wg punktu 5.3., aby końcowe stężenie roztworów wzorcowych wynosiło:  $2,88$ ;  $5,76$ ;  $11,52$ ;  $14,4$ ;  $28,8$  i  $57,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ .

Roztwory przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 7 dni.

### 6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

#### 6.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym, umożliwiającym wykonanie oznaczeń przy długości fali  $262$  lub  $328 \text{ nm}$ .

#### 6.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie 2-nitroanizolu w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna wypełniona fazą oktadecylową o uziarnieniu  $5 \text{ } \mu\text{m}$ , o długości  $250 \text{ mm}$  i średnicy wewnętrznej  $4,6 \text{ mm}$ .

#### 6.3. Pompa ssąca

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

#### 6.4. Naczynka do desorpcji

Naczynka szklane, o pojemności około  $3 \text{ ml}$  z nakrętkami i uszczelkami silikonowymi, wyposażone w zawory umożliwiające pobieranie roztworu bez otwierania naczyniek.

#### 6.5. Rurki pochłaniające

Dostępne w handlu rurki szklane zawierające dwie warstwy żelu krzemionkowego ( $100$  i  $50 \text{ mg}$ ), rozdzielone i ograniczone włóknem szklanym.

## 6.6. Strzykawki

Strzykawki do cieczy, o pojemności 10 ÷ 1 000 µl.

## 7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg zasad podanych w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek, przez rurkę pochłaniającą wg punktu 6.5., przepuścić do 18 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 9 l/h.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez 8 dni.

## 8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać rozdzielenie 2-nitroanizolu od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.2. przykładowe warunki oznaczania są następujące:

- faza ruchoma: metanol: woda 80:20
- temperatura kolumny 23 °C
- natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 0,6 ml/min
- długość fali analitycznej detektora 262 lub 328 nm
- dozowanie próbki 10 µl.

## 9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 10 µl roztworów wzorcowych roboczych 2-nitroanizolu wg punktu 5.4. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych stężenie 2-nitroanizolu, w mikrogramach na mililitr, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

## 10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza przesypać oddzielnie każdą warstwę żelu krzemionkowego z rurki pochłaniającej do naczynek do desorpcji wg punktu 6.4. Następnie dodać strzykawką wg punktu 6.6. po 1 ml metanolu wg punktu 5.2., naczynka szczelnie zamknąć i przeprowadzić desorpcję w ciągu 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Następnie pobrać po 10 µl roztworu znad żelu

krzemionkowego i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 8. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików 2-nitroanizolu wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Z krzywych wzorcowych odczytać zawartość 2-nitroanizolu w 1 ml badanego roztworu.

W taki sam sposób wykonać oznaczanie 2-nitroanizolu w roztworze znad krótszej warstwy żelu krzemionkowego. Zawartość 2-nitroanizolu oznaczona w krótszej warstwie żelu nie powinna przekraczać 10% ilości oznaczonej w dłuższej warstwie.

## 11. Wyznaczanie współczynnika desorpcji

Do pięciu naczynek do desorpcji, wg punktu 6.4., przesypać dłuższą (100 mg) warstwę żelu krzemionkowego z rurki pochłaniającej wg punktu 6.5. Następnie dodać po 20 µl roztworu wzorcowego podstawowego 2-nitroanizolu wg punktu 5.3. W szóstym naczynku przygotować roztwór kontrolny zawierający tylko żel. Naczynka szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać strzykawką wg punktu 6.6. po 1 ml metanolu wg punktu 5.2. Naczynka ponownie zamknąć i przeprowadzić desorpcję w ciągu 30 min, intensywnie wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Jednocześnie wykonać oznaczenie 2-nitroanizolu, w co najmniej trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 1 ml metanolu wg punktu 5.2. po 20 µl roztworu wzorcowego podstawowego 2-nitroanizolu wg punktu 5.3. Tak uzyskane roztwory badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 8.

Współczynnik desorpcji 2-nitroanizolu ( $d$ ) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

- $P_d$  – średnia powierzchnia pików 2-nitroanizolu na chromatogramach roztworów po desorpcji,
- $P_o$  – średnia powierzchnia pików o czasie retencji 2-nitroanizolu na chromatogramach roztworu kontrolnego,
- $P_p$  – średnia powierzchnia pików 2-nitroanizolu na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynnika desorpcji 2-nitroanizolu ( $\bar{d}$ ) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości ( $d$ ).

Współczynnik desorpcji należy wyznaczać dla każdej nowej partii rurek pochłaniających wg punktu 6.5.

## 12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie 2-nitroanizolu ( $X$ ) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

- $c_1$  – stężenie 2-nitroanizolu w roztworze znad pierwszej warstwy żelu krzemionkowego, odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- $c_2$  – stężenie 2-nitroanizolu w roztworze znad drugiej warstwy żelu krzemionkowego, odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- $V$  – objętość powietrza przepuszczonego przez rurkę pochłaniającą, w litrach,
- $\bar{d}$  – średnia wartość współczynnika desorpcji wyznaczona zgodnie z punktem 11.

### Adres do korespondencji/Contact details:

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

