

Izocyjanian 3-izocyjanianometylo- -3,5,5-trimetylocykloheksylu

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej¹

3-Isocyanatomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexyl isocyanate

Determination in workplace air with high-performance
liquid chromatography

dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

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

mgr MARZENA BONCZAROWSKA

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

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

Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź

Numer CAS 4098-71-9

Streszczenie

Izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (diizocyjanian izofofonu, DIF) występuje w postaci bezbarwnej lub lekko żółtawej cieczy. Związek jest stosowany głównie do produkcji poliuretanu o dużej odporności chemicznej i mechanicznej, a także do produkcji: farb, lakierów, powłok tkanin oraz usztywnień ortopedycznych (tzw. lekki gips). Narażenie zawodowe na DIF może powodować: silne podrażnienia błon śluzowych górnych i dolnych dróg oddechowych, oczu, a także ataki astmy oskrzelowej lub objawy alergicznego podrażnienia skóry.

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czulej metody oznaczania DIF w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od $1/10 \div 2$ wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482.

Do badań wykorzystano chromatograf ciekowy Waters Alliance wyposażony w detektor spektrofotometryczny i kolumnę Ascentis Express RP-Amide o wymiarach 250×3 mm.

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w powietrzu DIF na filtrze z włókna szklanego impregnowanego roztworem 1-(2-pyridylo)piperazyny (1,2-PP), ekstrakcji powstałej pochodnej za pomocą mieszaniny acetonitrylu (ACN) i dimetylu sulfotlenku (DMSO) oraz chromatograficznej analizie tak uzyskanego roztworu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku pochodnej DIF z filtrów wynosi 0,94. Zależność wskazań detektora spektrofotometrycznego od analizowanych stężeń DIF ma charakter liniowy ($r = 0,9992$) w zakresie stężeń $0,27 \div 5,33 \mu\text{g/ml}$ ($0,004 \div 0,08 \text{ mg/m}^3$ dla próbki powietrza o objętości 200 l). Granica wykrywalności i oznaczalności tej metody wynosi odpowiednio $0,000322$ i $0,001072 \mu\text{g/ml}$. Metoda spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN EN 482 pod kątem czułości oznaczeń, precyzji i dokładności.

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

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

Metoda umożliwia selektywne oznaczanie izomerów DIF w obecności innych izocyjanianów.

Opracowana metoda oznaczania DIF w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

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: izocyjaniany, narażenie zawodowe, powietrze na stanowisku pracy, wysokosprawną chromatografia cieczowa, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

3-Isocyanatomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexyl isocyanate (isophorone diisocyanate, DIF) is a colorless to pale yellow liquid. It is commonly used in the manufacturing of polyurethane of high chemical and mechanical resistance. It is also used in the production of paints, lacquers, fabric coatings and so called lightweight gypsum. Occupational exposure to DIF can cause severe irritant effects on mucous membranes, the respiratory tract and the eyes, and an acute attacks of an asthma. The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for the determination of DIF concentrations in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of standard PN-EN 482. The study was performed using a liquid chromatograph equipped with a spectrofluorimetric detector (FLD). All chromatographic analyses were carried out using an Ascentis Express RP-Amide 250 x 3 mm analytical column. The described method is based on the collection of DIF on a glass fiber filter impregnated with 1-(2-pyridyl)piperazine solution, extraction of formed derivative with mixture of acetonitrile: dimethylsulfoxide and chromatographic analysis of resulted solution by means of HPLC technique. The average recovery of DIF from filters amounted to 0.94. The method is linear ($r = 0.9992$) within the investigated working range 0.027–5.33 µg/ml, which is equivalent to air concentrations from 0.004–0.08 mg/m³ for a 200-L air sample. The calculated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of DIF amounted to 0.00032 and 0.0017 µg/ml respectively. The described method enables selective determination of DIF in workplace atmosphere in the presence of other compounds at concentrations from 0.004 mg/m³ (1/10 MAC value). The method is characterized by good precision and accuracy and meets the criteria for the performance of procedures for the measurement of chemical agents, listed in EN 482. The method may be used for the assessment of occupational exposure to and the associated risk to workers' health. The method for determining DIF 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: isocyanates, occupational exposure, workplace air, high performance liquid chromatography, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

Izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylo-cykloheksylu (DIF) powstaje w wyniku reakcji diaminu izofoforonu i fosgeny. Związek ten występuje w postaci bezbarwnej lub lekko żółtawej cieczy. DIF doskonale miesza się z: eterami, ketonami oraz węglowodorami aromatycznymi i alifatycznymi. DIF jest substancją reaktywną wchodzącą w reakcje ze wszystkimi związkami zawierającymi aktywny atom wodoru (tj.: woda, alkohole, fenole, aminy, amidy, uretany). Związek jest stosowany głównie do produkcji poliuretanu o dużej odporności chemicznej i mechanicznej, a także do produkcji: farb, lakierów, powłok tkanin oraz usztywnień ortopedycznych (tzw. lekki gips), (HSDB 2014; *Ligocka, Jakubowski* 2005).

Najbardziej prawdopodobnymi drogami narażenia pracowników na DIF są: narażenie inhalacyjne i bezpośredni kontakt ze skórą. Szkodliwe działanie tego związku wynika z jego silnych właściwości drażniących i uczulających. U pracowników narażonych na DIF stwierdzano objawy alergicznego podrażnienia skóry, a w przypadku lakiernika stosującego farby zawierające DIF także objawy astmy (*Ligocka, Jakubowski* 2005).

Zharmonizowaną klasyfikację oraz oznakowanie DIF, zgodnie z tabelą 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmienia-

jącego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwanego rozporządzeniem

CLP (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r.), przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Klasyfikacja i oznakowanie DIF zgodnie z obowiązującymi aktami prawnymi

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Acute Tox. 3 Toksyczność ostra – droga oddechowa (kat. 3)	H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania
Skin Irrit. 2 Działanie drażniące na skórę (kat. 2)	H315 – działa drażniąco na skórę
Eye Irrit. 2 Działanie drażniące na oczy (kat. 2)	H319 – działa drażniąco na oczy
STOT 3 SE Działanie toksyczne na narządy docelowe – narażenie jednorazowe (kat. 3)	H335 – może powodować podrażnienie dróg oddechowych
Resp. Sens 1 Działanie mutagenne na komórki rozrodcze po podaniu drogą dożołądkową (kat. 1B)	H 334 – może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania
Skin. Sens 1 Działanie uczulające na skórę (kat. 1)	H317 – może powodować reakcję alergiczną skóry

Obowiązująca wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) w powietrzu na stanowiskach pracy (rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12.06.2018 r.) dla 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu wynosi 0,04 mg/m³.

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania izomerów tego związku

w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary jego stężeń, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN-482.

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

Założenia opracowanej metody

Istnieje ograniczona liczba dostępnych danych literaturowych dotyczących oznaczania izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF) w powietrzu. Metodę oznaczania tego związku w powietrzu zaproponowano w Occupational Safety and Health Administration OSHA (OSHA 1988). Polegała ona na: przepuszczeniu badanego powietrza przez filtr z włókna szklanego nasączony roztworem 1-(2-pirydylo)piperazyny, ekstrakcji powstałej na filtrze pochodnej mieszaniny acetonitrylu i dimetylosulfotlenku (DMSO) oraz oznaczeniu stężeń tego związku z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Metodę ozna-

czania izocyjanianów w powietrzu zaproponowano w NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health), (NIOSH 1994). Metoda ta polegała na przepuszczeniu badanego powietrza przez płuczkę zawierającą toluenowy roztwór 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny i oznaczeniu powstałych trwałych pochodnych z zastosowaniem HPLC. Kolejne metodyki oznaczania izocyjanianów, opracowane w NIOSH, zakładały wykorzystanie do celów derywatywacji tryptaminy (NIOSH 1998) i 1-(9-antracenylo-metylo)piperazyny (NIOSH 2003). Metodyka opracowana w laboratoriach Health and Safety Executive (HSE) zakładała wykorzystanie do derywatywacji 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny (płuczka i filtr) oraz oznaczanie powstałej pochodnej z zasto-

sowaniem HPLC z detekcją spektrofotometryczną lub elektrochemiczną (HSE 2014).

Metodyki opracowane przez pracowników Occupational Safety and Health Administration (OSHA) zakładały zastąpienie płuczek filtrami z włókna szklanego, które nasączano roztworem 1-(2-pirydylo)piperazyny (1,2-PP). Powstałe pochodne, po ekstrakcji są oznaczane z zastosowaniem HPLC z detekcją spektrofotometryczną lub fluorescencyjną (OSHA 1988; 1989a; 1989b). Oznaczanie izocyjanianów (w postaci pochodnej z dibutyloaminą) jest możliwe również przy zastosowaniu HPLC sprzężonej ze spektrometrem mas (Driffield i in. 2007; Nordqvist i in. 2003).

1-(2-Pirydylo)piperazyna jest związkiem najpowszechniej stosowanym w oznaczeniach izocyjanianów. W handlu są dostępne wzorce pochodnych niektórych związków z tej grupy oraz gotowe do użycia filtry z włókna szklanego nasączone roztworem 1,2-PP.

Na podstawie dostępnych danych z piśmiennictwa, dotyczących oznaczania izocyjanianów w powietrzu, do opracowania metody zastosowano metodę chromatografii cieczowej z detekcją spektrofluorymetryczną zapewniającą największą czułość oznaczeń. Do pobierania próbek powietrza wykorzystano metodę dozometrii indywidualnej z wykorzystaniem filtrów szklanych impregnowanych roztworem 1,2-PP. Do opracowania metody oznaczania DIF w powietrzu przyjęto następujące założenia:

- pobieranie dwóch próbek w ciągu zmiany roboczej,
- objętość pobranej próbki powietrza około 200 l,
- zakres pomiarowy $0,004 \div 0,08 \text{ mg/m}^3$.

Aparatura

W badaniach wykorzystano chromatograf cieczowy Waters Alliance 2695 wyposażony w: pompę poczworną, termostat, detektor spektrofluorymetryczny Waters 2475 (FLD), kolumnę analityczną Ascentis Express RP Amide (250 × 3 mm, średnica ziaren 5 μm, wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym łańcuchami węglowymi (C-18) z wbudowanymi grupami amidowymi), automatyczny dozownik próbek oraz komputer z programem sterowania i zbierania danych.

Do pobierania próbek powietrza zastosowano średnioprzepływowe aspiratory indywidualne (GilAir 3 firmy Gililian) umożliwiające pobieranie powietrza ze strumieniem objętości ok. 60 l/h.

Do odważania odczynników stosowano wagę analityczną Sartorius, a do ekstrakcji analizowanych związków z filtrów wykorzystano wytrząsarkę mechaniczną Buhler SM 30 Control.

Materiały i odczynniki

W badaniach zastosowano: filtry z włókna szklanego Whatman GF/A 37 mm, filtry strzykawkowe z membraną z PTFE (Supelco), pipety automatyczne oraz szkło miarowe klasy A. Do badań stosowano odczynniki o czystości co najmniej cz.d.a lub do HPLC firm: JT Baker (acetonitryl, chlorek metylenu, heksan), Sigma – Aldrich (1-(2-pirydylo)-piperazyna), POCh (dimetylu sulfotlenek). Wzorec pochodnej DIF z 1-(2-pirydylo)piperazyną zsyntetyzowano w laboratorium. Woda o czystości do HPLC pochodziła ze stacji oczyszczania wody Hydrolab R-10.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Dobór optymalnych warunków rozdziału chromatograficznego

Z danych literaturowych wynika, że izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF) po przekształceniu w pochodną może występować w postaci dwóch izomerów optycznych (OSHA 1988). Dodatkowo, każda substancja reagująca z 1,2-PP może interferować z pochodną DIF. Obecność w badanej próbce substancji

interferujących wymaga dobrania warunków rozdzielania chromatograficznego (rodzaj kolumny analitycznej, modyfikacja składu fazy ruchomej, pH fazy ruchomej), tak by umożliwić selektywne oznaczenie DIF. Na podstawie danych literaturowych stwierdzono, że izocyjaniany można oznaczać z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej i kolumn analitycznych wypełnionych złożami: C-8 (NIOSH 1994; 2003; OSHA 1989a; 1989b), C-18 (NIOSH 1998; HSE

2014), CN (OSHA 1989b) lub fazą oktadecylową z wbudowanymi w łańcuch węglowy grupami amidowymi (Cramer 2005). Zastosowanie tej ostatniej fazy stacjonarnej umożliwia analizę pochodnych izocyjanianów z wykorzystaniem fazy ruchomej złożonej z acetonitrylu i wody (bez konieczności używania nietrwałych roztworów buforowych). Celem określenia selektywnych warunków oznaczania DIF w obecności innych izocyjanianów w mieszaninie acetonitrylu i dimetylu sulfotlenku (ACN: DMSO 9: 1, $v: v$) przygotowano roztwory pochodnych: izocyjanianu cykloheksylu (ICH), izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF), diizocyjanianu tolueno-2,4-diyłu (2,4-TDI), diizocyjanianu tolueno-2,6-diyłu (2,6-TDI), HDI (diizocyjanianu heksano-1,6-diyłu) i MDI (4,4'-metylenobis(fenyloizocyjanianu) z 1,2-PP.

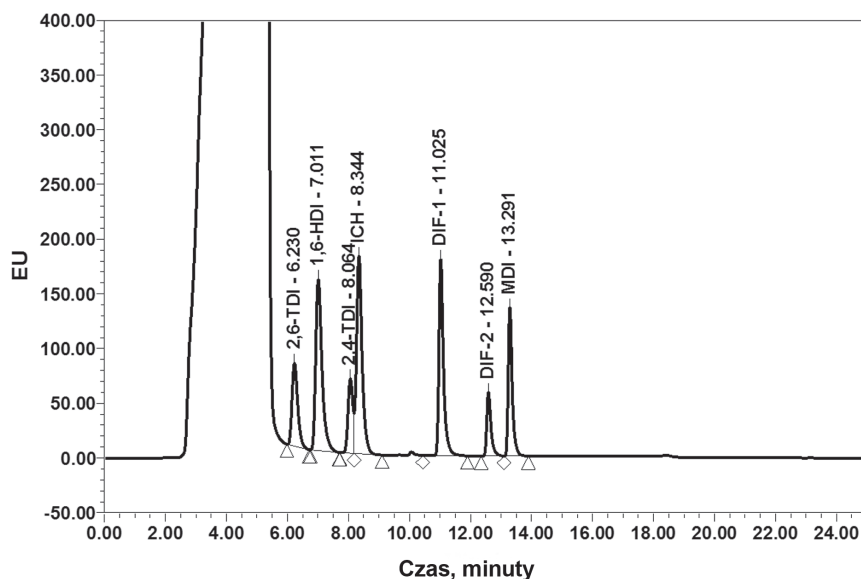
Pochodne poddano analizie chromatograficznej. Optymalne warunki rozdzielania chromatograficznego dla izomerów pochodnej DIF i pochodnych pozostałych izocyjanianów, mogących występować w badanym powietrzu, dobierano przy zastosowaniu kolumny Ascentis Express RP-Amide 250 × 3 mm wypełnionej złożem o średnicy ziaren 5 μm . Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu i wody o zmiennym w trakcie trwania analizy składzie procentowym (elucja gradientowa). Długość fali wzbudzenia i emisji ($\lambda_{ex} = 240 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 370 \text{ nm}$) dobrano na podstawie danych literaturowych (OSHA 1988). Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem FLD przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.
Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem FLD

Kolumna analityczna Ascentis Express RP-Amide 250mm x 3mm, 5 μm			
Faza ruchoma Program – gradient ($v: v$)		acetonitryl (A)	woda (B)
	0 min	35	65
	2 min	35	65
	10 min	60	40
	12 min	60	40
	12,5 min	35	65
	23 min	35	65
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej		0,4 ml/min	
Temperatura kolumny		40 °C	
Długość fali wzbudzenia/emisji		240 nm/370 nm	
Objętość próbki		2 μl	

Zastosowane w analizie warunki pracy chromatografu cieczowego (tab. 2.) umożliwiają selektywne oznaczenie obu izomerów pochodnej DIF. Podane warunki rozdziału chromatograficznego umożliwiają także selektywną analizę DIF w mieszaninie innych, najczęściej stosowanych w przemyśle izocyjanianów (izocyjanianu cykloheksylu (IC), izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF), diizocyjanianu tolueno-2,4-diyłu (2,4-TDI), diizocyjanianu tolueno-2,6-diyłu (2,6-TDI), diizocyjanianu heksano-1,6-diyłu (HDI) i 4,4'-metylenobis(fenyloizo-

cyjanianu (MDI)) oraz czynnika derywatyzującego (1,2-PP). Chromatogram mieszaniny sześciu pochodnych izocyjanianów (rozdzielonych na kolumnie Ascentis Express RP-Amide przy zastosowaniu podanych w tabeli 2. warunków pracy chromatografu cieczowego) przedstawiono na rysunku 1. Podane warunki chromatograficznego oznaczania można modyfikować (zmiana kolumny, fazy ruchomej), dostosowując zdolność rozdzielczą układu chromatograficznego do konkretnych potrzeb wynikających z obecności w badanym środowisku pracy innych niż badana substancja.



Rys. 1. Chromatogram mieszaniny sześciu związków (pochodne 2,6-TDI; 1,6-HDI; 2,4-TDI; ICH, izomery DIF oraz MDI). Kolumna Ascentis Express RP-Amide. Detektor FLD

Badanie zakresu stosowania liniowości i precyzji metody analitycznej

W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF) przygotowano trzy serie po siedem filtrów szklanych impregnowanych roztworem 1,2-PP, na które naniesiono po 100 μ l roztworów wzorcowych pochodnej DIF o stężeniach: 19,8; 39,5; 98,8; 197,5; 296,3 i 395 μ g/ml, co odpowiada stężeniom czystego związku: 0; 8; 16; 40; 80; 120 i 160 μ g/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w naczynkach szkla-

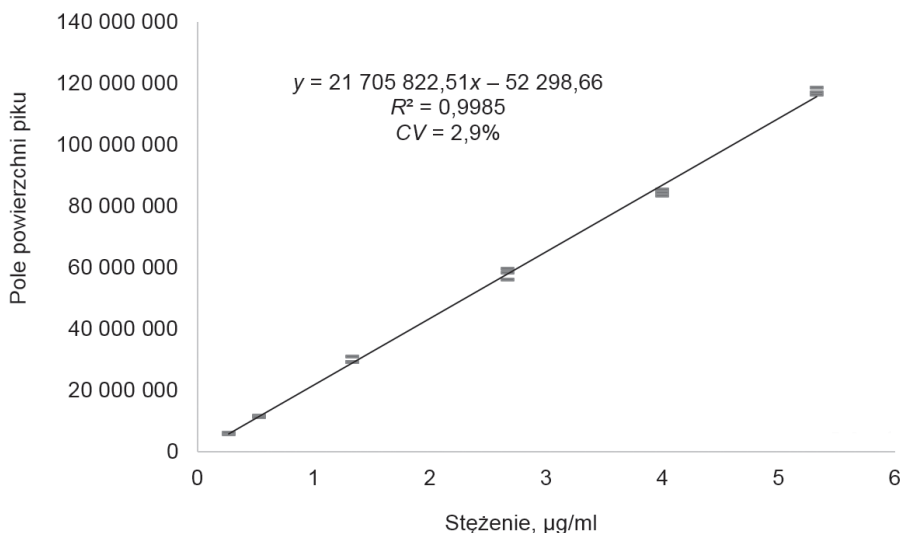
nych o pojemności 4 ml, a następnie poddano 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu 3 ml roztworu do ekstrakcji (ACN: DMSO) i wytrząsarki mechanicznej. Stężenia czystego związku w 1 ml ekstraktu wynoszą odpowiednio: 0,27; 0,53; 1,33; 2,67; 4,0 i 5,33 μ g. Tak uzyskane roztwory wzorców DIF przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μ m i poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody w badanym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 3. i graficznie na rysunku 2.

Tabela 3.

Wyniki wzorcowania DIF na filtrach z włókna szklanego impregnowanych roztworem 1,2-PP

Parametry badane	Stężenie DIF, μ g/ml					
	0,27	0,53	1,33	2,67	4,00	5,33
Pole powierzchni pików	5 621 236,9	11 327 224,6	2 9085 376,5	55 896 138,5	83 323 000,0	1161 60 944,2
	5 748 666,8	11 713 120,7	29 076 232,5	59 505 819,0	84 317 734,8	118 633 156,2
	6 016 617,3	11 280 098,6	30 817 620,9	58 324 584,4	85 295 665,6	117 025 202,9
Średnia wartość pola powierzchni pików	5 795 507,0	11 440 148,0	29 659 743,3	57 908 847,3	84 312 133,5	117 273 101,1
Odchylenie standardowe, SD	201 809,1	237 572,7	1 002 761,8	1 840 401,1	986 344,7	1 254 610,7
Współczynnik zmienności, CV, %	3,48	2,08	3,38	3,18	1,17	1,07



Rys 2. Krzywa wzorcowa DIF na filtrach z włókna szklanego impregnowanych roztworem 1,2-PP

Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że zależność odpowiedzi detektora spektrofluorymetrycznego na analizowane stężenia DIF (suma pól powierzchni pików izomerów DIF) w badanym zakresie stężeń 0,27 ÷ 5,33 µg/ml ma charakter liniowy. Zależność tę opisuje równanie $y = 21705822,5x - 52298,7$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) dla trzech serii kalibracyjnych wynosi 2,9 %, współczynnik regresji $r = 0,9992$.

Precyzję oznaczeń sprawdzono na podstawie analizy ($n = 10$) roztworów DIF o stężeniach: 0,27; 1,33 i 5,33 µg/ml. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 4. Wartości względnego odchylenia standardowego rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla badanych stężeń wynoszą odpowiednio: 2,0; 2,8 i 2,8 %, co świadczy o wysokiej precyzji oznaczeń.

Tabela 4.
Wyniki badania precyzji metody oznaczania DIF w powietrzu

Numer analizy	Stężenie DIF, µg/ml		
	0,27	1,33	5,33
1	5 800 872,19	37 196 149,69	123 364 016,56
2	5 596 414,95	34 991 311,56	122 204 821,36
3	5 727 018,03	35 102 526,97	116 497 553,17
4	5 839 346,99	33 773 109,97	117 799 866,49
4	5 875 574,83	36 180 365,28	127 616 790,83
6	5 736 516,29	35 964 079,21	125 916 513,09
7	5 991 656,39	35 617 931,27	124 342 164,46
8	5 834 149,66	35 937 828,38	120 512 370,25
9	5 631 346,14	35 252 586,29	124 326 955,11
10	5 738 385,77	37 072 297,62	122 141 056,98
Średnia	5 777 128,124	35 708 818,62	122 472 210,8
Odchylenie standardowe, SD	116 891,0	1 014 175,7	3 457 865,6
Współczynnik zmienności, CV, %	2,02	2,84	2,82

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń DIF

W celu określenia ewentualnych strat DIF podczas pobierania próbek powietrza przygotowano trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego pokrytych roztworem 1,2-PP, na które naniesiono po 100 ml roztworów wzorcowych pochodnej DIF o stężeniach (w przeliczeniu na czysty związek): 8; 40 i 160 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w głowicach do pobierania próbek i przepuszczono za pomocą średnioprzepływowych aspiratorów indywidualnych 200 litrów powietrza, ze stałym strumieniem objętości 1 l/min. Po tym czasie filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 3 ml mieszaniny ACN: DMSO oraz wytrząsarki mechanicznej. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 mm, a następnie poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warun-

kach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku, uzyskane w analizach ekstraktów, porównano do wyników analiz ekstraktów filtrów, na które naniesiono takie same ilości DIF i przez które nie przepuszczano powietrza.

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń DIF przedstawiono w tabeli 5. Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analitu. Średnie wartości współczynnika odzysku DIF z filtrów z włókna szklanego (pokrytych roztworem 1,2-PP), przez które przepuszczono próbkę powietrza o objętości 200, dla trzech analizowanych zawartości DIF na filtrach (0,8; 4; i 16 $\mu\text{g}/\text{na}$ filtrze) wynoszą odpowiednio: 0,97 ($SD - 0,024$); 0,97 ($SD - 0,019$) i 0,9 ($SD - 0,019$). Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku wynosi 0,94 ($SD - 0,037$).

Tabela 5.
Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń DIF

Medium pochłaniające	Zawartość DIF na filtrze, μg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku	Średnia wartość współczynnika odzysku
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego impregnowanego roztworem 1,2-PP	0,8	4 515 849,573 4 740 022,320 4 169 944,318	4 363 356,024	0,98	0,97
			4 201 115,333	0,94	
			4 227 684,520	0,95	
			4 399 636,688	0,98	
			4 456 742,893	1,00	
			4 435 610,707	0,99	
		SD 0,024 CV 2,5%			
	4	23 914 165,399 24 096 500,313 24 752 674,207	23 580 298,605	0,97	0,96
			23 409 942,642	0,97	
22 743 419,777			0,94		
23 094 622,337			0,95		
22 490 333,195			0,93		
23 653 780,071			0,98		
	SD 0,019 CV 2,0%				
16	103 819 719,531 118 491 740,300 111 075 916,123	98 701 707,409	0,89	0,90	
		99 835 844,025	0,90		
		10 427 7389,298	0,94		
		99 853 713,753	0,90		
		98 266 620,436	0,88		
		99 687 672,554	0,90		
	SD 0,019 CV 2,1%				
Średni współczynnik odzysku, \bar{S}_r , %		0,94			
Odchylenie standardowe, SD		0,037			
Współczynnik zmienności, CV , %		3,9			

Badanie warunków przechowywania pobranych na filtry próbek DIF

W celu zbadania trwałości próbek DIF pobranych na filtry impregnowane roztworem 1,2-PP przygotowano trzy serie po osiemnaście filtrów, na które naniesiono po 100 µl roztworów wzorcowych DIF o stężeniach: 8; 40 i 160 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w szczelnie zamkniętych naczynkach szklanych o pojemności 4 ml i przechowywano w chłodziarce, a następnie po: 10; 20 i 30 dniach przechowywania poddawano ekstrakcji po 6 filtrów z każdego stężenia (30 min, 3 ml mieszaniny ekstrakcyjnej ACN: DMSO, wytrząsarka mechaniczna).

Ekstrakty przepuszczono przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 µm i poddawano analizie chromatograficznej. Wartości pól powierzchni pików badanego związku, uzyskane w analizach ekstraktów, porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania DIF na filtrach z włókna szklanego, impregnowanych roztworem 1,2-PP, przedstawiono w tabeli 6. Wyrażone w procentach, średnie wartości odzysku DIF dla próbek (0,8; 4; i 16 µg DIF na filtrze) po 30 dniach przechowywania wynoszą: 100,4 (*SD* – 4,4); 98,4 (*SD* – 3,1) i 95,3% (*SD* – 11,2). Średnia (dla trzech stężeń) wartość odzysku wynosi 98,0 % (*SD* – 7,1).

Tabela 6.

Badanie warunków przechowywania DIF na filtrach z włókna szklanego impregnowanych roztworem 1,2-PP

Czas, dni	Zawartość DIF na filtrze								
	0,8 [% odzysku]			4,0 [% odzysku]			16,0 [% odzysku]		
10	100,4	104,4	102,4	102,8	100,1	100,9	91,5	90,9	89,1
	102,1	404,5	102,6	100,3	99,7	118,4	88,8	91,5	91,9
	<i>Śr</i>	102,7 %		<i>Śr</i>	103,7 %		<i>Śr</i>	90,6 %	
	<i>SD</i>	1,6		<i>SD</i>	7,3		<i>SD</i>	1,3	
	<i>CV</i>	1,5 %		<i>CV</i>	7,0 %		<i>CV</i>	1,5 %	
	Średnia wydajność ekstrakcji, <i>Śr</i> 99,0% Odchylenie standardowe, <i>SD</i> 7,4 Współczynnik zmienności, <i>CV</i> 7,5 %								
20	98,8	102,4	103,3	102,4	98,0	102,6	91,3	90,2	91,8
	101,7	102,9	89,1	99,9	101,9	104,5	91,6	89,6	89,2
	<i>Śr</i>	99,7 %		<i>Śr</i>	101,6 %		<i>Śr</i>	90,6 %	
	<i>SD</i>	5,4		<i>SD</i>	2,3		<i>SD</i>	1,1	
	<i>CV</i>	5,4 %		<i>CV</i>	2,2 %		<i>CV</i>	1,2 %	
	Średnia wydajność ekstrakcji, <i>Śr</i> 101,6% Odchylenie standardowe, <i>SD</i> 2,3 Współczynnik zmienności, <i>CV</i> 2,2								
30	100,7	103,6	102,6	97,2	103,0	100,9	97,3	85,2	112,9
	91,8	103,0	100,6	98,4	95,7	95,0	99,9	95,3	81,4
	<i>Śr</i>	100,4 %		<i>Śr</i>	98,4 %		<i>Śr</i>	95,3 %	
	<i>SD</i>	4,4		<i>SD</i>	3,1		<i>SD</i>	11,2	
	<i>CV</i>	4,4 %		<i>CV</i>	3,1 %		<i>CV</i>	11,8 %	
	Średnia wydajność ekstrakcji, <i>Śr</i> 98,03 % Odchylenie standardowe, <i>SD</i> 7,1 Współczynnik zmienności, <i>CV</i> 7,2 %								

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności DIF przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego (Dobecki 2000)*. Obliczono wartość średnią i odchylenie standardowe sygnału tła o czasie retencji izomerów pochodnych DIF uzyskanych z analizy ekstraktów dwudziestu filtrów impregnowanych roztworem 1,2-PP (próbki zerowe), a następnie, uwzględniając współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej, obliczono granicę wykrywalności (GW) i granicę oznaczalności (GO) na podstawie wzorów:

$$GW = \frac{SD \cdot 3}{b} \text{ i } GO = \frac{SD \cdot 10}{b},$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe,

b – współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej.

Wyniki analiz dotyczących wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności DIF z zastosowaniem techniki HPLC-FLD przedstawiono w tabeli 7. Obliczone granice wykrywalności i oznaczalności wynoszą odpowiednio: 0,00032 i 0,0011 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 7.

Wyznaczanie granic wykrywalności (GW) i oznaczalności (GO) DIF. HPLC-FLD, Kolumna Ascentis Express RP-Amide

Wyznaczone parametry	Wartości sygnału (pole powierzchni piksu)	
		10 294,0 8 720,7 11 794,9 13 799,8 8 522,4 9 865,6 11 058,2 8 918,7 9 570,1 10 458,9
Średnie pole powierzchni, $n = 20$	10 493,3	
Odchylenie standardowe, SD	2334,3	
Współczynnik zmienności, CV , %	22,15	
Granica wykrywalności, X_{GW} , $\mu\text{g/ml}$	0,000322	
granica oznaczalności, X_{GO} , $\mu\text{g/ml}$	0,00107	

Walidacja metody

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

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- granica wykrywalności 0,00032 $\mu\text{g/ml}$
- granica oznaczalności 0,0011 $\mu\text{g/ml}$
- zakres pomiarowy 0,27 ÷ 5,33 $\mu\text{g/ml}$ (stężenia czystych związków);

0,004 ÷ 0,08 mg/m^3

(dla próbki powietrza 200 l)

– współczynnik korelacji $r = 0,9992$

– precyzja badania 5,2%

– względna niepewność całkowita 20%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono warunki oznaczania stężeń izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (DIF) w powietrzu na stanowiskach pracy. Opracowana metoda polega na zatrzymaniu DIF (w postaci pochodnej) na filtrach z włókna szklanego, impregnowanych roztworem 1,2-PP. Powstałą pochodną można z wysoką (ok. 100%) wydajnością ekstrahować z filtrów za pomocą mieszaniny acetonitrylu i dimetylu sulfotlenku zmieszanych w stosunku 9: 1. Zastosowane warunki analizy chromatogra-

ficznej (kolumna Ascentis Exspress RP-Amide o wymiarach: 250 x 3 mm, elucja gradientowa) pozwalają na selektywne oznaczenie izomerów pochodnej DIF w obecności innych pochodnych izocyjanianów (TDI, ICH, HDI, MDI). Opracowana metoda umożliwia oznaczanie stężeń DIF w granicach $0,004 \div 0,08 \text{ mg/m}^3$ ($1/10 \div 2$ wartości NDS). Opracowaną metodę oznaczania DIF w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

- Cramer H.M. (2005). Analysis of 1-(2-pyridyl)-piperazine (12PP) Derivatives of Diisocyanates Using Ascentis™ RP-Amide. Application Report 220. Sigma-Aldrich [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Application_Notes/t005220.pdf].
- Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 3(25) [publication in Polish].
- Driffield M., Bradley E.L., Castle L. (2007). A method of test for residual isophorone diisocyanate trimer in new polyester-polyurethane coatings on light metal packaging using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 2, 1141(1), 61–66.
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2014). Isophorone diisocyanate [https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~S03hnl:1].
- HSE, Health and Safety Executive (2014). Methods for the Determination of Hazardous Substances. MDHS 25/4. Organic isocyanates in air [http://www.hse.gov.uk/pubns/mdhs/].
- Ligocka D., Jakubowski M. (2005). Izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 3(45) [publication in Polish].
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety Health (1994). Manual of Analytical Methods. Isocyanates. Monomeric. Method 5521. Fourth Edition [https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5521.pdf].
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety Health (1998). Manual of Analytical Methods. Isocyanates. Meth-
- od 5522. Fourth Edition [https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5522.pdf].
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety Health (2003). Manual of Analytical Methods. Isocyanates Total (MAP). Method 5525. Fourth Edition [https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5525.pdf].
- Nordqvist Y., Nilsson U., Colmsjö A. (2003). Evaluation of denuder sampling for a mixture of three common gaseous diisocyanates. Anal. Bioanal. Chem. 375(6), 786–791.
- OSHA, Occupational Safety & Health Administration (1988). Sampling & Analytical Methods Organic Method #PV2034. Isophorone Diisocyanate (IPDI) [https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/partial/pv2034/2034.html].
- OSHA, Occupational Safety & Health Administration (1989a). Sampling & Analytical Methods Organic Method #42. Diisocyanates [https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org042/org042.html].
- OSHA, Occupational Safety & Health Administration (1989b). Sampling & Analytical Methods Organic Method #47. Methylene Bisphenyl Isocyanate (MDI) [https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org047/org047.html].
- PN-EN 482+A1: 2016 Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Polish standard].
- PN-Z-04131-6:2008 Ochrona czystości powietrza – Badania zawartości izocyjanianów – Część 6: Oznaczanie izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [Polish standard].
- Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12.06.2018 r. w sprawie najwyższych dopuszczal-

nych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 2018, poz. 1286 [Polish legal act].

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 1272/2008 z dnia 16.12.2008 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 [Polish legal act].

**PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA IZOCYJANIANU
3-IZOCYJANIANOMETYLO-3,5,5-TRIMETYLOCYKLOHEKSYLU W POWIETRZU
NA STANOWISKACH PRACY Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją SPEKTROFLUORYMETRYCZNĄ**

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (CAS: 4098-71-9) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofлуometryczną (FLD).

Najmniejsze stężenie izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,004 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 200 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: przepuszczeniu badanego powietrza przez filtr impregnowany roztworem 1-(2-pirydylo)piperazyny, ekstrakcji powstałej pochodnej za pomocą mieszaniny acetonitrylu i dimetylu sulfotlenku oraz chromatograficznej analizie tak uzyskanego roztworu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

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

4.2. Dokładność ważenia

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

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi
Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji chemicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich utylizacją.

5. Odczynniki i roztwory

5.1. Acetonitryl

Stosować acetonitryl o czystości do HPLC.

5.2. Dimetylu sulfotlenek

Stosować dimetylu sulfotlenek wg punktu 4.1.

5.3. Izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu

Stosować izocyjanian 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu wg punktu 4.1.

5.4. 1-(2-Pirydylo)piperazyna (1,2-PP)

Stosować 1-(2-pirydylo)piperazynę wg punktu 4.1.

5.5. Heksan

Stosować heksan o czystości do HPLC.

5.6. Dichlorometan

Stosować dichlorometan o czystości do HPLC.

5.7. Woda destylowana

Stosować wodę o czystości do HPLC.

5.8. Roztwór do ekstrakcji

Zmieszać ze sobą acetonitryl wg punktu 5.1. i dimetylu sulfotlenku wg punktu 5.2. w stosunku 9: 1 (v: v).

5.9. Pochodna 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu

Rozpuścić 100 mg izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu wg punktu 5.3. w 25 ml dichlorometanu wg punktu 5.6. Roztwór ten powoli dodawać do roztworu przygotowanego przez rozpuszczenie 300 mg 1-(2-pirydylo)piperazyny wg punktu 5.4. w 50 ml dichlorometanu wg punktu 5.6. Otrzymany roztwór mieszać przez około 60 min,

a następnie zatężyć do objętości ok. 10 ml w strumieniu azotu. Zateżony roztwór dodawać po kropli, cały czas mieszając do 800 ml heksanu wg punktu 5.5. Powstały osad odsączyć i rozpuścić ponownie w możliwie najmniejszej ilości dichlorometanu i ponownie rekrytalizować w heksanie. Powstały osad zebrać i wysuszyć pod próżnią. Otrzymaną pochodną przechowywać w szczelnie zamkniętym pojemniku.

5.10. Roztwór wzorcowy podstawowy izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksyłu

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml odmierzyć 1,975 mg pochodnej izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksyłu wg punktu 5.9. Pochodną rozpuścić w roztworze do ekstrakcji wg punktu 5.8. Jeden mililitr tak przygotowanego roztworu zawiera 0,395 mg pochodnej izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksyłu.

5.11. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 1 ml odmierzyć: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 ml roztworu wzorcowego podstawowego pochodnej izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksyłu wg punktu 5.10. 1 ml tak przygotowanych roztworów zawiera odpowiednio w mikrogramach: 19,8; 39,5; 98,8; 197,5; 296,3 i 395 pochodnej izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksyłu, co odpowiadają stężeniom czystego związku: 8; 16; 40; 80; 120 i 160 µg/ml.

5.12. Roztwór pokrywający

Odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.7. 100 µl 1,2-PP wg punktu 5.4. i przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 5.1. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi 1 mg/ml.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofлуorymetrycznym.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować chromatograficzną kolumnę analityczną RP-Amide o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm, o średnicy ziaren 5 µm.

6.3. Filtry z włókna szklanego

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm i średnicy porów 1,6 µm.

6.4. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry strzykawkowe o średnicy 13 mm z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 µm.

6.5. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności: 1; 5 i 100 ml.

6.6. Naczynka szklane (wiale)

Stosować wiale o pojemności 2 i 4 ml.

6.7. Pipety do cieczy

Stosować pipety o pojemności 0,1 ÷ 5 ml.

6.8. Pompa ssąca z głowicą

do pobierania próbek powietrza

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości około 1 l/min.

6.9. Waga analityczna

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

6.10. Wytrząsarka mechaniczna

Stosować wytrząsarkę mechaniczną.

7. Przygotowanie filtrów szklanych do pobierania próbek powietrza

Na filtry z włókna szklanego wg punktu 6.3. nanieść po 0,5 ml roztworu pokrywającego wg punktu 5.12. Filtry pozostawić do wyschnięcia w ekcykatorze. Suche filtry przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.

8. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z 04008-7. Filtry z włókna szklanego przygotowane wg punktu 7. umieścić w głowicy do pobierania próbek powietrza. Za pomocą pompy ssącej wg punktu 6.8. przepuścić przez filtr maksymalnie 200 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 1 l/min. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce.

9. Warunki pracy chromatografu

Przykładowe warunki pracy chromatografu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.
Warunki pracy chromatografu

Kolumna analityczna Ascentis Express RP-Amide 250mm x 3mm, 5µm		
Faza ruchoma Program – gradient (v: v)	acetonitryl (A)	woda (B)
0 min	35	65
2 min	35	65
10 min	60	40
12 min	60	40
12,5 min	35	65
23 min	35	65
Nateżenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	40 °C	
Długość fali wzbudzenia/emisji	240 nm/370 nm	
Objętość próbki	2 µl	

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Przygotować 7 filtrów wg punktu 7. Na sześć filtrów nanieść za pomocą pipety wg punktu 6.7. po 100 µl roztworów wzorcowych roboczych pochodnej izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu wg punktu 5.11., na siódmy filtr nanieść 100 µl roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.8. jako próbkę zerową. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6. Do każdego naczynka dodać po 3 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.8. i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki wg punktu 6.10. Stężenia izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu w jednym mililitrze ekstraktu wynoszą odpowiednio: 0; 0,27; 0,53; 1,33; 2,67; 4; 5,33 µg. Ekstrakty przesączyć przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.4. i poddać analizie chromatograficznej w warunkach określonych w punkcie 9. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu naniesionego na filtr, a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni piku badanego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

11. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6.

Następnie dodać 3 ml roztworu ekstrakcyjnego wg punktu 5.8., naczynka szczelnie zamknąć i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą wytrząsarki wg punktu 6.10. Otrzymane roztwory przepuścić przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.4. Uzyskane roztwory poddać analizie chromatograficznej w warunkach określonych w punkcie 9.

W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody należy wykonać powtarne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie uwzględnić w obliczeniach.

12. Obliczanie wyniku oznaczenia

Stężenie izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu (X) w badanym powietrzu obliczyć, w miligramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

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

w którym:

- c – zawartość izocyjanianu 3-izocyjanianometylo-3,5,5-trimetylocykloheksylu odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

13. Protokół z badań

W protokole z badań należy podać następujące informacje:

- powołanie na niniejszą procedurę,
 - wszystkie dane konieczne do pełnej identyfikacji próbki,
 - wyniki wyrażone w sposób podany w punkcie 12.,
- wszystkie szczegóły niepodane w niniejszej procedurze lub pozostawione do wyboru, a także wszelkie czynniki, które mogły wpłynąć na wyniki.

Adres do korespondencji/Contact details:

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