

3,3'-Dimetoksybenzydyna

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

3,3'-Dimethoxybenzidine

Determination in workplace air

dr JOANNA KOWALSKA

<https://orcid.org/0000-0002-1431-3089>

dr inż. ANNA JEŻEWSKA

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

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa

Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warsaw

Numer CAS: 119-90-4

Streszczenie

3,3'-Dimetoksybenzydyna (DMOB) jest substancją zaklasyfikowaną do grupy substancji rakotwórczych. W Polsce zaproponowano wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla tej substancji na poziomie 0,2 mg/m³.

Celem pracy było opracowanie i walidacja czulej metody oznaczania stężeń 3,3'-dimetoksybenzydyny w środowisku pracy w zakresie 1/10 ÷ 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN-482.

Opracowana metoda oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny polega na: przepuszczeniu badanego powietrza (zawierającego DMOB) przez filtr z włókna szklanego (pokryty kwasem siarkowym), elucji w środowisku alkalicznym do toluenu, przeniesieniu do acetonitrylu i oznaczeniu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Badania wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem fluorescencyjnym (FLD). Do badań wykorzystano kolumnę Ultra C18 o wymiarach: 250 x 4,6 mm, z przedkolumną o wymiarach: 10 x 4,0 mm (Restek, USA).

Opracowana metoda jest liniowa w zakresie stężeń 1,08 ÷ 21,60 µg/ml, co odpowiada zakresowi 0,02 ÷ 0,4 mg/m³ dla próbki powietrza o objętości 54 l.

Opisana metoda analityczna umożliwia oznaczenie 3,3'-dimetoksybenzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy w obecności: 1,4-fenylenodiaminy, benzydyny, aniliny, 3,3'-dimetylobenzidyny, 2-nitrotoluenu, 3,3'-dichlorobenzidyny i azobenzenu. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania zawarte w normie europejskiej PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda może być wykorzystana do oceny narażenia zawodowego na 3,3'-dimetoksybenzydynam w powietrzu na stanowiskach pracy.

Metoda oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny 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: 3,3'-dimetoksybenzydyna, *o*-dianizydyna, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

3,3'-Dimethoxybenzidine (DMOB) is a substance classified as a carcinogen. The recommended maximum admissible concentration (MAC) value for this substance in workplace air is 0.2 mg/m³. The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for the determination of 3,3'-dimethoxybenzidine concentrations in workplace air in the

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników III etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, dofinansowanego w latach 2014-2016 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

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

range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of standard PN-EN 482. The method consists in passing air that contains DMOB through a sulfuric acid-treated glass fiber filters, washing out the substance settled on the filter, using water and solution of sodium hydroxide, liquid-liquid extraction with toluene, replacing solvent with acetonitrile and analyzing the obtained solution. Studies were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. An Agilent Technologies (Germany) liquid chromatograph, series 1200, with a fluorescence detector (FLD) was used in the experiment. In the test, an Ultra C18 column of dimensions: 250 x 4.6 mm, with a 10 x 4.0 mm precolumn (Restek, USA) was applied. This method is linear within the 1.08 µg/ml to 21.60 µg/ml working range, which is equivalent to air concentrations from 0.02 to 0.4 mg/m³ for a 54-L air sample. The analytical method described in this paper allows for selective determination of 3,3'-dimethoxybenzidine in workplace air in the presence of 1,4-phenylenediamine, benzidine, aniline, 3,3'-dimethylbenzidine, 2-nitrotoluene, 3,3'-dichlorobenzidine and azobenzene. 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 3,3'-dimethoxybenzidine and the associated risk to workers' health. The developed method of determining 3,3'-dimethoxybenzidine 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: 3,3'-dimethoxybenzidine, *o*-dianisidine, analytical method, liquid chromatography, workplace air, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

3,3'-Dimetoksybenzydyna (DMOB, *o*-dianisidine) jest krystalicznym ciałem stałym, które może być bezbarwne lub przybierać barwę fioletową. 3,3'-Dimetoksybenzydynie przypisano klasę zagrożenia Carc. 1B zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego (WE) nr 1272/2008 (Rozporządzenie... 2008). Substancja może wchłaniać się do ustroju zarówno poprzez układ oddechowy, pokarmowy, jak i wnikać przez skórę (Szymańska i in. 2006). 3,3'-Dimetoksybenzydyna jest stosowana do produkcji barwników i farb, głównie azowych, wykorzystywanych do: barwienia skór naturalnych, tworzyw sztucznych, wyrobów tekstylnych, papieru. Ponadto 3,3'-dimetoksybenzydyna służy do produkcji izocyjanianu 3,3'-dimetoksybenzydyny, związku stosowanego do produkcji klejów oraz jako komponent do produkcji poliuretanów (GESTIS 2018). W niewielkich ilościach 3,3'-dimetoksybenzydyna jest wykorzystywana jako odczynnik do oznaczania glukozy (np. w produktach spożywczych metodą enzymatyczną), (Belitz i in. 2009).

Narażenie zawodowe na 3,3'-dimetoksybenzydynamę może występować podczas syntezy tej substancji lub produkcji barwników oraz ich stosowania. W latach 2005-2013 liczba osób narażonych na 3,3'-dimetoksybenzydynamę stopniowo wzrastała. W Polsce w 2012 r. najwięcej osób narażonych na 3,3'-dimetoksybenzydynamę było zatrudnionych w 11 zakładach pracy, 9 z nich stanowiły uczelnie i instytuty badawcze, a 2 to laboratoria. Na aminę było narażonych 408 osób, na sole 3,3'-dimetoksybenzy-

dyny – 16 osób, ogółem 424 osoby były narażone na aminę i sole 3,3'-dimetoksybenzydyny (Starek 2015).

W 2015 roku zaproponowano ustalenie wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla 3,3'-dimetoksybenzydyny w wysokości 0,2 mg/m³ (Starek 2015). Podstawą do obliczenia wartości NDS dla 3,3'-dimetoksybenzydyny były dane z piśmiennictwa na temat ryzyka wystąpienia nowotworów u szczurów samców przewlekle narażonych na ten związek drogą pokarmową (Morgan i in. 1989). Wartość normatywu higienicznego dla 3,3'-dimetoksybenzydyny obowiązuje w Polsce od 2018 r. (Rozporządzenie... 2018). Stąd powstała potrzeba opracowania metody oznaczania tej substancji dostosowanej do wartości dopuszczalnej w zakresie od 0,1 ÷ 2 wartości NDS, tj. od 0,02 ÷ 0,4 mg/m³.

Dostępne publikacje dotyczą przeprowadzanych badań działania toksykologicznego oraz oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny w: próbkach środowiskowych (woda), płynach ustrojowych człowieka (mocz), syntetycznych barwnikach (Shelke i in. 2005; Sparr i in. 2002; Sutthivaiyakit i in. 2005).

Metoda EPA nr 553 dotyczy między innymi oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny w próbkach wody z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Zawartość różnych benzydyn i pestycydów (zawierających w swojej cząsteczce atomy azotu) oznaczano w próbkach wody, stosując kolumnę stalową wypełnioną fazą oktadecylową C-18 (15 ÷ 25 cm x 2 mm i.d.; 4 ÷ 10 µm) i fazą ruchomą acetonitryl/woda (EPA 1992).

Norma PN-EN ISO 14362-1:2017 pozwala na zidentyfikowanie w tekstyliach niektórych amin aromatycznych uwalnianych z barwników azowych. Wśród 22 amin aromatycznych, ekstrahowanych z wyrobów włókienniczych, oznacza się 3,3'-dime-toksybenzydynamę. Załącznik tej normy opisuje metody analityczne oznaczania niektórych amin: chromatografię cienkowarstwową (TLC), chromatografię cieczową (HPLC-DAD; HPLC-MS), chromatografię gazową (GC-MS) i elektroforezę kapilarną (CE). Wyizolowane z próbek wyrobu włókienniczego (w wieloetapowym procesie) aminy, rozpuszczone w: metanolu, octanie etylu lub eterze 1-butylometylowym, są oznaczane chromatograficznie, najczęściej metodą HPLC-DAD lub GC-MS. Do rozdziału amin, metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zaleca się kolumnę Zorbax Eclipse XDB C18 o wymiarach: 150 x 4,6 mm, 3,5 μm , temperaturze 32 °C i fazę ruchomą programowaną metanol/bufor fosforanowy. Długość fali analitycznej (przy której można prowadzić oznaczenie) to: 240; 280; 305 i 380 nm. Przy metodzie HPLC-MS dla tego samego typu kolumny, utrzymywanej w temperaturze 40 °C, proponowana jest faza ruchoma acetonitryl/bufor amonowy. Metoda GC-MS wykorzystuje kolumnę kapilarną DB-35MS (o wymiarach: 35 m x 0,25 mm x 0,25 μm) i temperaturę kolumny programowaną od 100 do 310 °C (PN-EN ISO 14362-1:2017) w celu zidentyfikowania i oznaczania ilościowego amin aromatycznych.

Metoda NIOSH nr 5013, za pomocą której można oznaczyć zarówno 3,3'-dime-toksybenzydynamę, jak i benzydynamę oraz 3,3'-dime-toksybenzydynamę w próbkach powietrza, jest oparta na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (długość fali 280 nm). Zakres oznaczalności 3,3'-dime-toksybenzydiny z zastosowaniem tej metody wynosi $9,0 \div 187,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($0,56 \div 11,7 \mu\text{g}/\text{ml}$). Jako próbnika użyto filtrów teflonowych (o średnicy 37 mm, 5 μm), z których ekstrahowano anality 2 ml wody. Zastosowano kolumnę Radial Pak C18 (10 cm x 8 mm; 10 μm) w temperaturze pokojowej i fazę metanol/bufor fosforowy 60/40 (v/v). Granica wykrywalności (LOD) dla 3,3'-dime-toksybenzydiny wynosi 4,5 μg w próbce (1,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (NIOSH 1984). Autorzy sugerują możliwość obniżenia granicy wykrywalności metody poprzez zastosowanie detekcji fluorescencyjnej ze wzbudzeniem przy 285 nm i emisją przy 375 nm.

Metoda OSHA 71 pozwala oznaczyć 3,3'-dime-toksybenzydynamę na poziomie około 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Zasada pobierania próbek polega na przepuszczeniu

100 l powietrza, zawierającego aminy aromatyczne (DMOB, DMB i 4,4' metylenobis(2-chloroanilinę – MOCA), przez dwa połączone szeregowo filtry z włókna szklanego, z naniesionym kwasem siarkowym (OSHA 2018). Dane literaturowe zalecają ten sposób pobierania próbek powietrza, zawierających aminy aromatyczne w celu poprawy trwałości próbek, ponieważ sole amin są bardziej stabilne, niż same aminy. Aminy wykazują właściwości zasadowe i łatwo ulegają działaniu kwasów nieorganicznych, tworząc sole. Następnie substancje wymywano z filtra wodą i po zmianie środowiska na zasadowe ekstrahowano toluenem i oznaczano, jako pochodną bezwodnika kwasu heptafluorobutyrowego metodą chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (GC-ECD). Stosowano kolumnę kapilarną SBP-5 (o wymiarach 15 m x 0,32 mm i.d., 1,0 film) o temperaturze 250 °C. Metoda ta wymaga oznaczania obu tych substancji w czasie jak najkrótszym od momentu pobrania próbek powietrza (ze względu na małą trwałość związków). Granica wykrywalności dla 3,3'-dime-toksybenzydiny wynosi 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Część doświadczalna pracy dotyczyła opracowania metody analitycznej oznaczania 3,3'-dime-toksybenzydiny w powietrzu na stanowiskach pracy, która ma służyć ocenie narażenia pracowników na tę substancję. Dlatego wybrano metodę dozymetrii indywidualnej, w której próbnik jest umieszczony w strefie oddychania pracownika, przez okres równy co najmniej 75% czasu trwania zmiany roboczej (dla 8-godzinnego dnia pracy będzie to okres minimum 6 godzin). Tak przeprowadzone pomiary uwzględniają wszystkie rodzaje czynności wykonywanych przez pracownika.

3,3'-Dimetoksybenzydyna w warunkach normalnych jest ciałem stałym, dlatego w celu wyizolowania tej substancji z powietrza w próbnikach należy zastosować filtry. Celem badań było oznaczenie małych ilości 3,3'-dime-toksybenzydiny, która w powietrzu w warunkach naturalnych jest substancją nietrwałą.

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

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: 3,3'-dimetoksybenzydynamę (Fluka, Switzerland), 3,3'-dimetylobenzydynamę (Sigma-Aldrich, USA), 3,3'-dichlorobenzydynamę, roztwór w metanolu o stężeniu 2 000 µg/ml (Supelco, USA), benzydynamę (Fluka, Switzerland), anilinę (Merck, Niemcy), azobenzon (Sigma-Aldrich, USA), 2-nitrotoluen (Fluka, Switzerland), 1,4-fenylendiaminę (Merck, Niemcy), acetonitryl (Merck, Niemcy), toluen (JTBaker, Holandia), kwas siarkowy(VI) o stężeniu 25% (POCH, Polska), kwas fosforowy(V) o stężeniu 85% (POCH, Polska), wodorofosforan sodu bezwodny (POCH, Polska), wodę o wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA), filtry z włókna szklanego GF/A o średnicy 37 mm (Whatman, Anglia) do pobierania próbek powietrza, filtry strzykawkowe nylonowe o średnicy 25 mm i wielkości porów 0,45 µm (Alltech, USA) do filtrowania roztworów przed analizą oraz szkło laboratoryjne, tj.: kolby miarowe, kolby stożkowe Erlenmayera o pojemności 25 ml wyposażone w: korki, pipety, strzykawki do cieczy i inne.

Podczas pokrywania filtrów z włókna szklanego kwasem siarkowym(VI), (0,26 mol/l) postępowano zgodnie ze sposobem opisanym w metodzie OSHA 71.

W celu optymalizacji sposobu pobierania i odzysku próbek powietrza oraz przeprowadzenia wa-

lidacji metody analitycznej przygotowano roztwory podstawowy 3,3'-dimetoksybenzydynamy (o stężeniu 2,16 mg/ml) poprzez odważenie wzorca w odmierzanej objętości acetonitrylu oraz roztwory robocze 3,3'-dimetoksybenzydynamy w acetonitrylu o stężeniach: 21,6; 27,0; 54,0; 108,0; 216,0 i 432,0 µg/ml. Tak przygotowane roztwory, przechowywane w szczelnie zamkniętych kolbach w chłodziarce, nie zmieniły swoich stężeń w ciągu sześciu dni.

Aparatura i wyposażenie pomocnicze

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies (Niemcy) seria 1200 z detektorem diodowym (DAD) i detektorem fluorescencyjnym (FL) sprzężonymi on-line. Próbkę wprowadzano za pomocą automatycznego podajnika próbek G2258-90010 (Agilent Technologies USA). Do pobierania próbek powietrza zawierających 3,3'-dimetoksybenzydynamę wykorzystano aspiratory typu GilAir 5 i Gilian LFS-113 (Sensidyne, USA). Do odważania wzorców stosowano wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA), a eksykator szalkowy serii EKS (WSL, Polska) był wykorzystywany do przechowywania filtrów. Odparowanie toluenu z ekstraktów do sucha prowadzono w strumieniu azotu (99.999% purity, Multax s.c. Polska).

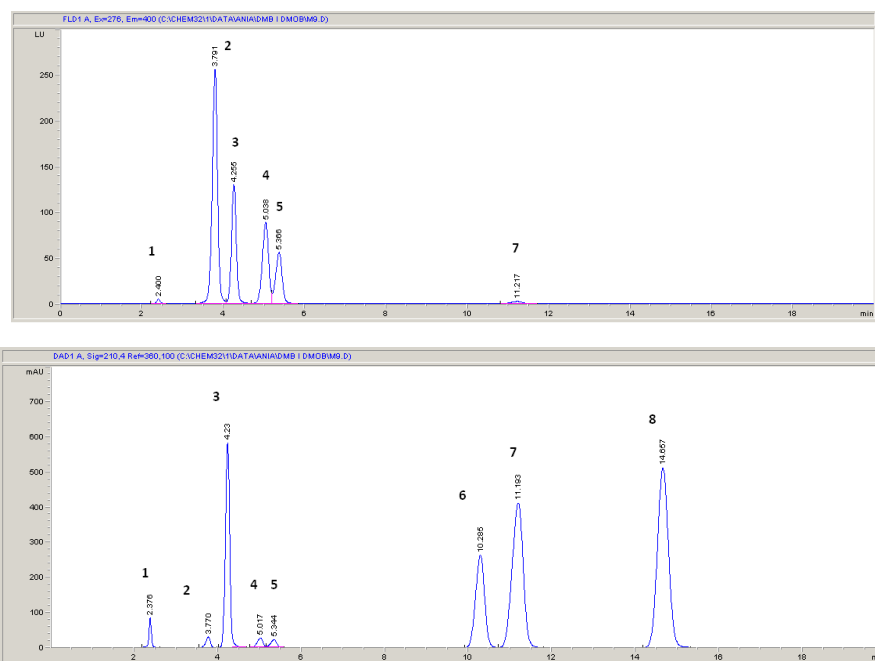
WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Warunki oznaczania chromatograficznego

Warunki prowadzenia procesu rozdzielania chromatograficznego zostały ustalone na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz wyników badań własnych (Kowalska, Jeżewska 2016; NIOSH 1984). Do badań zastosowano kolumnę chromatograficzną Ultra C18 (o długości 25 cm, uziarnieniu 5 µm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm). Jako fazę ruchomą stosowano acetonitryl: bufor fosforanowy (50: 50; v/v), a natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej – 1 ml/min. Objętość dozowanej próbki na kolumnę wynosiła 20 µl. W celu uzyskania prawidłowego rozdzielania analizę chromatograficzną 3,3'-dimetoksybenzydynamy i substancji współwystępujących prowadzono w różnych warunkach pracy chromatografu cieczowego. Zastosowano detekcję spektrofotometryczną,

wykorzystując długości fali analitycznej: 210, 288 i 304 nm detektora DAD i detekcję fluorescencyjną przy długości fali analitycznej detektora FLD: wzbudzenie 276 nm; emisja 400 nm.

3,3'-Dimetoksybenzydynamy może być oznaczana w ustalonych warunkach metodą chromatografii cieczowej w obecności innych substancji chemicznych, tj.: 3,3'-dimetylobenzydynamy, azobenzenu, aniliny, benzydynamy, 3,3'-dichlorobenzydynamy, benzydynamy i 2-nitrotoluenu (rys. 1.).



Rys 1. Chromatogramy 3,3'-dimetoksybenzydyny (DMOB) i następujących substancji współwystępujących: 1) 1,4-fenylendiamina; 2) benzydyna; 3) anilina; 4) 3,3'-dimetoksybenzydyna; 5) 3,3'-dimetylobenzydyna; 6) 2-nitrotoluen; 7) 3,3'-dichlorobenzydyna; 8) azobenzen. Kolumna Ultra C18 (250mm × 4,6 mm, 5 μm), faza ACN/bufor fosforanowy (pH 7), 50/50 (v/v); 1 ml/min, długość fali analitycznej detektora: A) DAD: 210 nm, B) FLD: wzbudzenie 276 nm, emisja 400 nm

Dalsze badania prowadzono z zastosowaniem detekcji fluorescencyjnej, która pozwala oznaczyć pochodną benzydyny na poziomie 100-krotnie mniejszych stężeń. Sprawdzono, że w ustalonych warunkach chromatograficznych najmniejsze stężenie 3,3'-dimetoksybenzydyny, jakie może być oznaczone, wynosi 1,08 μg/ml.

Pobieranie i przygotowywanie próbek powietrza do analizy

Na podstawie danych z piśmiennictwa ustalono, że 3,3'-dimetoksybenzydyna będzie pobierana na filtry z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym (OSHA 2018). 3,3'-Dimetoksybenzydyna jest związkiem nietrwałym i w warunkach naturalnych ulega utlenieniu pod wpływem światła. Aby temu zapobiec stosowane do pochłaniania filtry pokrywano kwasem siarkowym. Siarczan(VI) 3,3'-dimetoksybenzydyny, powstały na filtrach podczas pobierania próbek pod wpływem działania wodnych roztworów wodorotlenków, zostaje przekształcony z powrotem w aminę. Do całkowitego wymycia analitów z filtrów (o średnicy 37 mm) stosuje się zazwyczaj dość dużą ilość eluenta (od 2 do 10 ml), co powoduje rozcieńczenie analitów. Uzyskane w ten sposób stężenie analitu może być niewystarczające do jego oznaczania. W pracy zastosowano dodatkowe zatężenie – eks-

trakcję ciecz-ciecz. Do ekstrakcji wybrano toluen – rozpuszczalnik słabo rozpuszczalny w wodzie, łatwy do odparowania i o wysokiej czystości.

W celu zatężenia otrzymanego ekstraktu zastosowano etapowy sposób postępowania z próbką – wymywanie substancji z filtra i ponowne zagęszczenie oznaczanych substancji. Filtr z siarczanem(VI) 3,3'-dimetoksybenzydyny przenoszono do kolby stożkowej. Do kolby z filtrem dodawano 2 ml wody destylowanej i pozostawiano na około 1 godzinę. Następnie dodawano jeszcze 2 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,135 mol/l i 1 ml toluenu. Płyn w kolbie stożkowej wytrząsano przez 30 min. Roztwór nad filtra przenoszono do próbki i pozostawiano w spoczynku, aż do osiągnięcia stanu równowagi między fazą wodną i toluenową. Następnie pobierano 0,5 ml warstwy toluenowej i przenoszono do naczynka o pojemności 2 ml. Toluenu odparowywano w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml acetonitrylu. Tak uzyskany roztwór poddawano analizie chromatograficznej.

W celu ustalenia warunków pobierania próbek powietrza złożono układ składający się z próbki i pompy ssącej o regulowanym i kontrolowanym strumieniu objętości powietrza za pomocą rotametri. W próbniku umieszczono szeregowo dwa filtry z włókna szklanego pokryte kwasem siarkowym(VI).

Na pierwszy filtr wcześniej naniesiono 54 µg 3,3'-dimetoksybenzyny. Przez próbnik przepuszczono 540 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 90 l/h. Założono, że do drugiego filtra nie może przedostawać się więcej niż 10% analitu w stosunku do ilości oznaczonej w pierwszym filtrze. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Uzyskane wyniki badań (tab. 1.) wskazują, że 3,3'-dimetoksybenzydyna zatrzymuje się całkowicie

na I filtrze oraz, że do pobierania próbek powietrza zawierającego 3,3'-dimetoksybenzydynam można zastosować pojedynczy filtr, pokryty kwasem siarkowym(VI).

Tabela 1.

Wyniki adsorpcji 3,3'-dimetoksybenzyny (DMOB) na filtrach z włókna szklanego, pokrytych kwasem siarkowym (VI). Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

Rodzaj filtra	Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/h	Czas pochłaniania, h	Powierzchnia pików DMOB w roztworach po odzysku (wg wskazań integratora)		Zawartość substancji na II filtrze (w % ilości oznaczonej na I filtrze)
			I filtr	II filtr	
Filtr z włókna szklanego	90	6	3 156,85	2	0,06
z naniesionym kwasem siarkowym	90	6	3 184,1	1	0,03
	90	6	2 875	–	0

Badanie warunków przechowywania próbek

Trwałość pobranych próbek powietrza w zależności od czasu ich przechowywania badano w następujący sposób: na osiem filtrów nanoszono po 10,8 µg 3,3'-dimetoksybenzyny (50 µl roztworu o stężeniu 216 µg/ml). Próbkę ($n = 2$) analizowano

w dniu przygotowania próbek, oraz po: jednym, dwóch i pięciu dniach przechowywania w eksykatorze w zamkniętych pudełkach, osłonięte przed dostępem światła. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2. Uzyskane wyniki wskazują, że próbki były trwałe przez pięć dni.

Tabela 2.

Wyniki badania trwałości filtrów z włókna szklanego z naniesioną 3,3'-dimetoksybenzydynam (DMOB). Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

Czas przechowywania, liczba dni	Pole powierzchni pików	Średnie pole powierzchni pików	Odchylenie standardowe	Zmiana, %
0	769,9 665,6 621,5	685,7	76,2	–
1	689,2 777,0 621,1	695,73	48,1	1,5
2	648,1 640,8 668,3	652,4	14,2	4,9
5	699,4 654,3 678,9	677,52	22,6	1,2

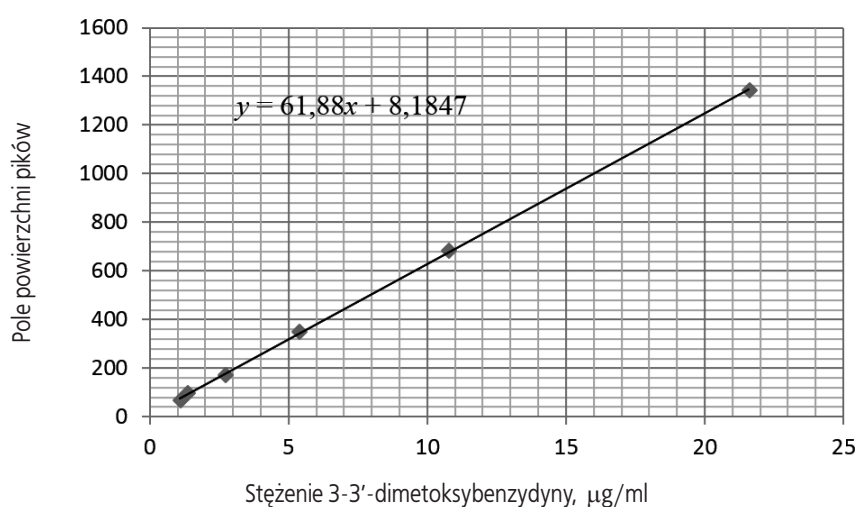
Kalibracja i precyzja

Ze względu na wieloetapowy sposób przygotowania próbki do analizy przyjęto, że krzywa kalibracyjna będzie przygotowywana poprzez nanoszenie roztworów wzorcowych o wzrastających stężeniach na filtry z włókna szklanego, pokryte kwasem siarkowym. Przy takim sposobie nie ma potrzeby wyznaczania wydajności odzysku. Ewentualne straty substancji, wynikające z kolejnych etapów przygotowania próbki do analizy, będą identyczne w przypadku badanej próbki, jak i przy sporządzaniu krzywej wzorcowej.

Zakres pomiarowy metody, wynikający z ustalonej wartości normatywu higienicznego, wynosi od

0,02 ÷ 0,4 mg/m³ 3,3'-dimetoksybenzydyny w acetonitrylu dla próbki powietrza o objętości 54 l. Roztwory do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej uzyskano w następujący sposób: naniesiono na filtry kolejno 50 µl każdego z sześciu roztworów roboczych 3,3'-dimetoksybenzydyny w acetonitrylu o stężeniach: 21,6; 27,0; 54,0; 108,0; 216,0 i 432,0 µg/ml. Przygotowano trzy serie po sześć filtrów. Następnie z filtrami postępowano wg rozdziału „Pobieranie i przygotowywanie próbek powietrza do analizy”.

Na rysunku 2. przedstawiono przebieg krzywej kalibracyjnej, którą sporządzono po uśrednieniu wyników analizy próbek roztworów wzorcowych 3,3'-dimetoksybenzydyny z trzech serii pomiarowych.



Rys. 2. Krzywa kalibracyjna uzyskana po uśrednieniu wyników analizy próbek roztworów wzorcowych 3,3'-dimetoksybenzydyny (DMOB) z trzech serii pomiarowych. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 40 °C, detektor FLD

W tabeli 3. przedstawiono parametry charakteryzujące wyznaczone krzywe kalibracyjne o równaniu $y = bx + a$. Krzywe kalibracyjne dla 3,3'-dimetoksy-

benzydyny miały przebieg liniowy w zakresie stężeń 1,08 ÷ 21,6 µg/ml.

Tabela 3.
Parametry krzywych kalibracyjnych 3,3'-dimetoksybenzydyny (DMOB)

Parametry krzywych kalibracyjnych DMOB	Numer serii	Wartość
Krzywa kalibracji	I	$y = 66,15 x + 33,2$
Współczynnik korelacji, r		0,9994
Krzywa kalibracji	II	$y = 59,6 x - 3,36$
Współczynnik korelacji, r		0,9996
Krzywa kalibracji	III	$y = 59,9 x - 5,28$
Współczynnik korelacji, r		0,9997
Średnia wartość współczynnika kalibracji	64,2	
Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji, S_b	2,98	
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, %	4,64	

W celu oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych przygotowano po osiem roztworów 3,3'-dimetoksybenzydyny w acetonitrylu o trzech różnych stężeniach: 1,08; 10,8 i 21,6 µg/ml. W tym celu naniesiono na filtry z kwasem siarkowym(VI) po 50 µl roztworów o stężeniach: 21,6; 216,0 i 432,0 µg/ml.

Po wyschnięciu filtry przygotowano do analizy chromatograficznej. Wartości charakteryzujące precyzję oznaczeń kalibracyjnych 3,3'-dimetoksybenzydyny w acetonitrylu metodą HPLC-FLD przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4.

Precyzja oznaczeń kalibracyjnych 3,3'-dimetoksybenzydyny (DMOB), (kolumna Ultra C18: 250 mm × 4,6 mm, 5 µm; faza ACN/bufor fosforanowy (pH 7), 50/50, v/v; 1 ml/min; długość fali analitycznej detektora: FLD – wzbudzenie 276 nm, emisja 400 nm)

Roztwór DMOB o stężeniu 1,08 µg/ml	Roztwór DMOB o stężeniu 10,8 µg/ml	Roztwór DMOB o stężeniu 21,66 µg/ml
I seria	II seria	III seria
Średnia powierzchnia pików 68,19	Średnia powierzchnia pików 705,99	Średnia powierzchnia pików 1 494,06
Odchylenie standardowe, S 1,20	Odchylenie Standardowe, S 9,24	Odchylenie standardowe S 19,42
Współczynnik zmienności, n_1 , % 1,76	Współczynnik zmienności, n_2 , % 1,31	Współczynnik zmienności, n_3 , % 1,30
Średni współczynnik zmienności, %		1,47
Całkowita precyzja badania, %		5,21

Walidacja metody

Granice wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie wyników analizy ślepej próbki. Walidację metody oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej

PN-EN 482+A1:2016. Parametry walidacyjne metody oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5.

Dane walidacyjne metody oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny (DMOB)

Wyznaczone parametry	Wartość
Zakres pomiarowy	0,02 ÷ 0,4 mg/m ³
Objętość próbki powietrza	54 l
Zakres krzywej wzorcowej	1,08 ÷ 21,60 µg/ml
Granica wykrywalności, LOD	6,27 ng/ml (116,1 ng/m ³)
Granica oznaczalności, LOQ	18,81 ng/ml (348,3 ng/m ³)
Całkowita precyzja badania	5,21%
Względna niepewność całkowita	11,42%
Niepewność rozszerzona	22,85%

PODSUMOWANIE

Przedmiotem pracy było opracowanie metody ilościowej umożliwiającej oznaczanie stężeń 3,3'-dimetoksybenzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy, które pozwolą na wyznaczenie wskaźników narażenia i ocenę ryzyka zawodowego. Przyjęty sposób przygotowania próbek do analizy chromatograficznej umożliwia wydzielenie i zateżanie analitu. Krzywe kalibracyjne dla 3,3'-dimetoksybenzydyny mają przebieg liniowy w zakresie stężeń 1,08 ÷ 21,60 µg/ml.

Dla próbek powietrza o objętości 54 l opracowana metoda spełnia wymagania normy europejskiej PN-EN 482+A1:2016 dotyczącej zakresu od 1/10 do 2 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia

i umożliwi oznaczenie stężeń 3,3'-dimetoksybenzydyny w zakresie 0,02 ÷ 0,4 mg/m³. Istnieje możliwość zmniejszenia zakresu pomiarowego metody (do zakresu 0,002 ÷ 0,04 mg/m³) poprzez zwiększenie objętości pobranych próbek powietrza (do 540 l powietrza) przy korzystaniu z jednej krzywej kalibracyjnej.

Opracowaną metodę oznaczania 3,3'-dimetoksybenzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2009). Food Chemistry, 4th revised and extended ed., 139, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI:10.1007/978-3-540-69934-7.

EPA Method 553 (1992). Determination of benzidines and nitrogen containing pesticides in water by liquid-liquid extraction and reverse phase high performance liquid chromatography, particle beam, and mass spectrometry. Revision 1.1. Environmental monitoring systems laboratory office of research and development U.S. Environmental protection agency Cincinnati, Ohio 45268.

GESTIS (2018). Substance database. BG Institute for Occupational Safety and Health. Sankt Augustin, Germany.

Kowalska J., Jeżewska A. (2016). Badania nad skuteczną metodą oznaczania 3,3'-dimetylobenzzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy [Studies on an efficient method for determining 3,3'-dimethylbenzidine in the workplace air]. *Medycyna Pracy* 67(1), 43–50.

Morgan D.L., Jameson C.W., Mennear J.H., Ulland B.M., Lemen J.K. (1989). Thirteen week toxicity studies of 3,3'-dimethoxybenzidine and C.I. Direct Blue 15 in the Fischer 344 rat. *Toxicology* 59, 297–309.

NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health (1984). Method 5013: dyes, benzidine-, o-tolidine-, o-dianisidine-. U.S., Department of Health and Human Services, Public Health Service. Centers for Disease Control, Manual of Analytical Methods, 3rd ed. Volumes 1 and 2 with 1985 supplement, and revisions. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, February, p. 50131.

OSHA, Occupational Safety & Health Administration (2018). Analytical Methods Manual. Method No 71: o-dianisidine, 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline), o-tolidine [online]. U.S. Department of Labor. Salt Lake City: OSHA [dostęp: 2018-04-29].

PN-EN 482+A1: 2016 Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Workplace exposure – General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents].

PN-EN ISO 14362-1:2017 Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników. Tekstylnia – Metody oznaczania niektórych amin aromatycznych powstałych z barwników azowych – Część 1: Wykrywanie zastosowania niektórych barwników azowych dostępnymi metodą z ekstrakcją i bez ekstrakcji włókien [PN-EN ISO 14362-1: 2017 General requirements for the characteristics of the procedure for measuring factors. Textiles – Methods for the determination of certain aromatic amines arising from azo dyes - Part 1: Detection of the use of some azo dyes available by the extraction method and without fiber extraction].

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. DzU 2018, poz. 1286 [Polish legal act].

Rozporządzenie (WE) nr 850/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29.04.2004 r. dotyczące trwałych zanieczyszczeń organicznych i zmieniające dyrektywę 79/117/EWG (OJ L 158, 30.4.2004, p. 7–49) [Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament].

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 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 (zwane rozporządzeniem GHS). Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r. (L 353) [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 (Text with EEA relevance)].

Shelke M., Sanghi S.K., Asthana A., Lamba S., Sharma M. (2005). Fast separation and sensitive detection of carcinogenic aromatic amines by reversed-phase m-liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* (2005) 1089, 52–58.

Sparr Eskilsson C., Davidsson R., Mathiassonet L. (2002). Harmful azo colorants in leather Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques. *J. Chromatogr. A* (2002) 955, 215–227.

Starek A. (2015). 3,3'-Dimetoksybenzydyna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [3,3'-Dimethoxybenzidine. Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)]. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* [Principles and Methods of Assessing the Working Environment] 3(85), 15–34.

Sutthivaiyakit P., Achatz S., Lintelmann J., Aungpradit T., Chanwirat R., Chumanee S., Kettrup A. (2005). LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 268–276.

Szymańska J.A., Frydrych B., Szymczak W. (2006). 3,3'-Dimetoksybenzydyna i jej sole. Wytyczne Szacowania Ryzyka Zdrowotnego Czynn timerakotwórczych 1, 19–39 [publication in Polish].

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA 3,3'-DIMETOKSYBENZYDYNY W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości 3,3'-dimetoksybenzydyny w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym. Metodę tę stosuje się podczas badania warunków sanitarno-higienicznych.

Najmniejsze stężenie 3,3'-dimetoksybenzydyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,02 mg/m³ dla próbki powietrza 54 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 zawierającego 3,3'-dimetoksybenzydynę przez filtr z włókna szklanego z naniesionym kwasem siarkowym. Po adsorpcji 3,3'-dimetoksybenzydyna jest wmywana z filtra wodą. Po zmianie środowiska na zasadowe wodorotlenkiem sodu, ekstrahowana toluenem i po zamianie rozpuszczalnika na acetonitryl analizowana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

4. Odczynniki, roztwory i materiały

Podczas analizy, jeśli nie ma innych wymagań, należy stosować substancje o stopniu czystości co najmniej cz.d.a. oraz wodę destylowaną o czystości do HPLC, zwaną w dalszej części normy wodą.

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

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

Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji w uprawnionych instytucjach.

4.1. Acetonitryl

4.2. 3,3'-Dimetoksybenzydyna

4.3. Kwas siarkowy(VI), roztwór o stężeniu 0,26 mol/l

4.4. Kwas ortofosforowy(V), stężony

4.5. Toluen

4.6. Wodorofosforan sodu bezwodny

4.7. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu 0,135 mol/l

4.8. Bufor fosforanowy do fazy ruchomej

Do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml odważyć około 7,1 g wodorofosforanu sodu wg punktu 4.6., uzupełnić do kreski wodą i dokładnie wymieszać. Następnie dodać taką ilość kwasu ortofosforowego(V) wg punktu 4.4., aby uzyskać roztwór o wartości pH = 7.

4.9. Roztwór wzorcowy podstawowy 3,3'-dimetoksybenzydyny

Odważyć 21,6 mg 3,3'-dimetoksybenzydyny wg punktu 4.2. i przenieść do kolby miarowej z ciemnego szkła o pojemności 10 ml, uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 4.1. i dokładnie wymieszać. Stężenie 3,3'-dimetoksybenzydyny w tak przygotowanym roztworze wynosi 2,16 mg/ml.

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

4.10. Roztwory wzorcowe robocze 3,3'-dimetoksybenzydyny

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml przenieść roztwór wzorcowy podstawowy wg punktu 4.9. w ilości: 0,1; 0,125; 0,25; 0,50; 1 i 2 ml, uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 4.1. i dokładnie wymieszać. Zawartość 3,3'-dimetoksybenzydyny w 1 ml tak przygotowanych roztworów wynosi odpowiednio: 21,6; 27; 54; 108; 216 i 432 µg.

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

4.11. Filtry

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm. Na filtry nanosić po 0,5 ml kwasu siarkowego(VI) wg punktu 4.3. i pozostawić do wyschnięcia. Suche filtry przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.

4.12. Azot

Stosować azot o czystości 5.0.

5. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz wymieniony niżej:

5.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem fluorescencyjnym i elektronicznym integratorem.

5.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną umożliwiającą rozdział 3,3'-dimetoksybenzyny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.: kolumnę wypełnioną fazą oktadecylową o długości 25 cm, średnicy wewnętrznej 4,6 mm i o uziarnieniu 5 µm z przedkolumną.

5.3. Strzykawki do cieczy

Stosować strzykawki do cieczy o pojemności od 10 ÷ 2 500 µl.

5.4. Pipety szklane

Stosować pipety do cieczy o pojemności 2 ml.

5.5. Kolby stożkowe

Stosować kolby stożkowe o pojemności 25 ml, wyposażone w korki.

5.6. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą, umożliwiającą pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 6.

5.7. Probówki

Stosować probówki o średnicy około 1 cm i pojemności powyżej 5 ml.

5.8. Naczynka

Stosować naczynka z nakrętkami o pojemności około 2 ml (np.: takie jak do automatycznego podajnika próbek chromatografu).

6. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiem zawartymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 4.11., umieszczony w oprawce, należy przepuścić 54 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 90 l/h.

Pobrane próbki, przechowywane w eksykatorze, zachowują trwałość przez co najmniej pięć dni.

7. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby uzyskać rozdział 3,3'-dimetoksybenzyny od substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu.

W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej o parametrach podanych w punkcie 5.2.,

oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

- faza ruchoma:
acetonitryl: bufor fosforanowy 50: 50
- natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 1 ml/min
- temperatura kolumny 40 °C
- długość fali analitycznej detektora fluorescencyjnego:
 - wzbudzenie 276 nm
 - emisja 400 nm
- objętość dozowanej próbki 20 µl.

8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na sześć filtrów wg punktu 4.11., umieszczonych oddzielnie w kolbach stożkowych o pojemności 25 ml wg punktu 5.5., nanieść kolejno 50 µl każdego roztworu wzorcowego roboczego wg punktu 4.10. Filtry pozostawić do wyschnięcia. Następnie dodać po 2 ml wody, kolby zamknąć i pozostawić na około 1 h. Dodać 2 ml wodorotlenku sodu wg punktu 4.7., 1 ml toluenu wg punktu 4.5. i pozostawić kolby na 30 min, wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Po tym czasie roztwory z nad filtrów przenieść do probówek wg punktu 5.7. Po osiągnięciu stanu równowagi między fazą wodną i toluenową pobrać za pomocą strzykawki (wg punktu 5.3.) 0,5 ml warstwy toluenowej i przenieść do naczynek wg punktu 6.8. Zawarty w naczynkach toluen odparować do sucha w strumieniu azotu wg punktu 4.12., a suchą pozostałość rozpuścić w 0,5 ml acetonitrylu wg punktu 4.1. W 1 ml tak uzyskanego roztworu znajduje się odpowiednio: 1,08; 1,35; 2,7; 5,4; 10,8 i 21,6 µg 3,3'-dimetoksybenzyny. Do chromatografu wprowadzić dwukrotnie po 20 µl tak uzyskanych roztworów. Odczytać powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż ±5% tej wartości. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych masę 3,3'-dimetoksybenzyny, w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

9. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza filtr przenieść do kolby wg punktu 5.5. i dalej postępować w taki sam sposób, jak przy sporządzaniu krzywej wzorcowej wg punktu 8. Do chromatografu wprowadzić dwukrotnie po 20 µl roztworów w acetonitrylu. Odczytać

z uzyskanych chromatogramów powierzchni pików 3,3'-dimetoksybenzydyny wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Masę 3,3'-dimetoksybenzydyny odczytać z krzywej wzorcowej.

10. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie 3,3'-dimetoksybenzydyny (X) w badanym powietrzu obliczyć, w miligramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

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

w którym:

- m – masa 3,3'-dimetoksybenzydyny w roztworze uzyskanym po odzysku z nad filtra odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza przez filtr, w litrach.

Adres do korespondencji/Contact details:

dr JOANNA KOWALSKA

e-mail: jokow@ciop.pl

dr inż. ANNA JEŻEWSKA

e-mail: anjez@ciop.pl

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

00-701 Warszawa, ul. Czerniakowska 16

POLSKA

