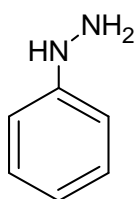


Fenylohydrazyna

- metody oznaczania

dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI
mgr MARZENA BONCZAROWSKA
dr JAN GROMIEC
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8



Numer CAS: 100-63-0

Słowa kluczowe: fenylohydrazyna, analiza powietrza, stanowisko pracy.

Keywords: phenylhydrazine, air analysis, workplace.

Streszczenie

Metodę stosuje się do oznaczania fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy. Metoda polega na absorpcji fenylohydrazyny w roztworze kwasu chlorowodorowego i oznaczeniu spektrofotometrycznym po wywołaniu

reakcji barwnej z kwasem fosfomolibdenowym lub metodą HPLC po przeprowadzeniu w pochodną za pomocą acetonu. Oznaczalność metody wynosi 2 mg/m³ (objętość próbki powietrza 100 l).

Summary

Air samples are collected by drawing a known volume of air through a bubbler containing 15 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution. After addition of 10 ml of 3% phosphomolybdic acid, absorbance of the resulted solution (phenylhydrazine hydrochloride - phosphomolybdic acid

complex) is than measured spectrophotometrically at λ - 730 nm.

The working range of the analytical method is from 8 to 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($2 \div 40 \text{ mg}/\text{m}^3$ for 100 l air sample).

Air samples are collected by drawing a known volume of air through a bubbler containing 15 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution. After derivatization with acetone (20 μl), the resulting solutions are analyzed by high performance chroma-

tography using ultraviolet ($\lambda = 270 \text{ nm}$) detection. The working range of the analytical method is from 0.008 to 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.2 \div 4 \text{ mg}/\text{m}^3$ for 100 l air sample).

UWAGI WSTĘPNE

Fenylohydrazyna (hydrazynobenzen) w temperaturze pokojowej jest bezbarwną lub bladożółtą cieczą o słabym aromatycznym zapachu. W niższych temperaturach występuje w postaci żółtych kryształów. Związek ten dobrze rozpuszcza się w wodzie. W każdym stosunku miesza się z: alkoholem, eterem, chloroformem i benzenem. Dobrze rozpuszcza się w chlorowanych rozpuszczalnikach i rozcieńczonych kwasach.

Fenylohydrazyna jest otrzymywana w reakcji diazowania amin aromatycznych (np. aniliny) za pomocą azotynu sodu i kwasu chlorowodorowego, a następnie przez działanie na powstały roztwór siarczynem (IV) sodu i wodorotlenkiem sodu. Związek ten ma charakter zasadowy i w reakcjach z kwasami nieorganicznymi tworzy sole.

Fenylohydrazyna jest stosowana w syntezie organicznej jako silny środek redukujący lub jako półprodukt w syntezie innych związków chemicznych (barwniki, leki). Fenylohydrazyna jest również stosowana jako odczynnik chemiczny służący identyfikacji aldehydów i ketonów oraz do identyfikacji i określania konfiguracji cukrów.

Najważniejsze właściwości fizykochemiczne fenylohydrazyny:

– wzór sumaryczny	$C_6H_8N_2$
– masa cząsteczkowa	108,14
– gęstość par (powietrze = 1)	3,7
– temperatura topnienia	19,5 °C
– temperatura wrzenia	243,5 °C
– temperatura samozapłonu	174 °C
– prężność par	0,035 hPa (w temp. 25 °C)
– gęstość	1,098 g/cm ³ (w temp. 20 °C)
– współczynnik podziału	oktanol-woda jako log Kow 1,25

– rozpuszczalność w wodzie	127 g/l (w temp. 25 °C)
– współczynnik przeliczeniowy	1 ppm = 4,4 mg/m ³ .

Fenylohydrazyna, zgodnie z tabelą 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwane rozporządzeniem CLP (Dz.Urz. UE z dnia 31 grudnia 2008 r., 3), została zaklasyfikowana jako:

- H350 – może powodować raka (Rakotw. Kat. 1B)
- H341 – podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne (Muta 2)
- H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania
- H311 – działa toksycznie w kontakcie ze skórą
- H301 – działa toksycznie po połknięciu
- H372 – powoduje uszkodzenie narządów przez długotrwałe lub powtarzane narażenie
- H319 – działa drażniąco na oczy
- H315 – działa drażniąco na skórę
- H317 – może powodować reakcję alergiczną skóry
- H400 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne.

Zgodnie z rozporządzeniem ministra pracy i polityki społecznej z dnia 29 listopada 2002 r. (Dz.U nr 217, poz. 1833) najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS) fenylohydrazyny wynosi 20 mg/m³.

PROCEDURA ANALITYCZNA

Metoda spektrofotometryczna

1. Zakres stosowania metody

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem spektrofotometrii w świetle widzialnym. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie fenylohydrazyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 2 mg/m^3 .

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 absorpcji fenylohydrazyny w roztworze kwasu chlorowodorowego o stężeniu $0,1 \text{ mol/l}$, wywołaniu barwnej reakcji z kwasem fosforomolibdenowym i spektrofotometrycznym oznaczeniu powstałego kompleksu przy długości fali $\lambda = 730 \text{ nm}$.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

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

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do $0,0002 \text{ g}$.

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji wzorcowych, 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 unieszkodliwianiem.

4.4. Wzorcowanie

Z uwagi na nietrwałość fenylohydrazyny (utlenianie) do przygotowywania roztworów wzorcowych należy stosować chlorowodorek fenylohydrazyny.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Fenylohydrazyna

Stosować według punktu 4.

5.2. Kwas fosforomolibdenowy

Stosować według punktu 4.

5.3. Kwas chlorowodorowy

Stosować według punktu 4.

5.4. Roztwór kwasu fosforomolibdenowego o stężeniu 3-procentowym

Odważyć dokładnie $0,54 \text{ g}$ kwasu fosforomolibdenowego wg punktu 5.2., przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml i rozpuścić w wodzie wg punktu 5.8. Po rozpuszczeniu uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Tak przygotowany roztwór odstawić na 24 h i po tym czasie przesączyć przez sączek bibułowy.

5.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego

Przygotować roztwór kwasu chlorowodorowego o stężeniu $0,1 \text{ mol/l}$.

5.6. Roztwór wzorcowy podstawowy fenylohydrazyny

Odważyć dokładnie $66,85 \text{ mg}$ chlorowodoru fenylohydrazyny wg punktu 5.1., przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml i rozpuścić w roztworze kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. W 1 ml tak przygotowanego roztworu znajduje się 1 mg fenylohydrazyny. Roztwór przechowywany w chłodziarce w szczelnie zamkniętym naczyniu jest trwały przez dziesięć dni.

5.7. Roztwór wzorcowy roboczy fenylohydrazyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml odmierzyć 10 ml roztworu wzorcowego podstawowego i kolbę uzupełnić do kreski roztworem kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. Końcowe stężenie fenylohydrazyny w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,4 mg/ml.

5.8. Woda destylowana
Stosować według punktu 4.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Kolby pomiarowe
Stosować kolby pomiarowe o pojemności 20 i 50 ml.

6.2. Pipety szklane
Stosować pipety szklane o pojemności: 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 ml.

6.3. Płuczki
Stosować płuczki bełkotkowe ze szkłem spiekany o pojemności 50 ml.

6.4. Pompa ssąca
Stosować pompę ssącą z przepływomierzem, umożliwiającą pobieranie powietrza ze stałym strumieniem objętości według punktu 7.

6.5. Spektrofotometr
Stosować spektrofotometr umożliwiający wykonanie oznaczeń przy długości fali 730 nm.

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-07. Za pomocą pompy wg punktu 6.4. przepuścić przez płuczki wg punktu 6.3., zawierające 15 ml 0,1 mol/l roztworu kwasu chlorowodorowego, około 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości do 1 l/min. Pobrane próbki powietrza należy zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe przez dziesięć dni.

8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do siedmiu kolb pomiarowych o pojemności 50 ml odmierzyć odpowiednio, w mililitrach: 0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 i 10,0 roztworu wzorcowego roboczego fenylohydrazyny wg punktu 5.7., co odpowiada zawartości czystego związku, w miligramach: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 i 4,0. Do każdej z kolb dodać po 10 ml roztworu kwasu fosfomolibdenowego wg punktu 5.4., wymieszać i uzupełnić do kreski roztworem kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. Z tak otrzymanych roztworów pobrać po 1 ml i dodać po 2 ml wody destylowanej. Zmierzyć absorbancję tak przygotowanych roztworów wobec próby odczynnikowej (próbka o zerowej zawartości fenylohydrazyny) przy długości fali $\lambda = 730$ nm.

9. Wykonanie oznaczania

Zawartość płuczek przenieść do kolb pomiarowych o pojemności 50 ml. Każdą płuczkę przepłukać dwukrotnie 5 ml wody destylowanej, dodając roztwory do roztworu pochłaniającego. Do próbek dodać po 10 ml kwasu fosfomolibdenowego wg punktu 5.4., wymieszać i uzupełnić do kreski roztworem 0,1 mol/l kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. Z kolb pobrać po 1 ml roztworów, dodać 2 ml wody destylowanej i zmierzyć absorbancję przy długości fali 730 nm. W przypadku próbek, których wartości absorbancji przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtórne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie uwzględnić w obliczeniach.

10. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie fenylohydrazyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

c – zawartość fenylohydrazyny odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,

V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując dwuwiązkowy spektrofotometr Cary 300 firmy Varian.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,002 ÷ 0,08 mg/ml
2 ÷ 40 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 100 l)
- granica oznaczania ilościowego, X_{ozn} 1,9 µg/ml

- granica wykrywalności 0,6 µg/ml
- współczynnik korelacji charakteryzujący liniowość krzywych wzorcowych, r 0,999
- całkowita precyzja badania, V_c 17,8%
- niepewność całkowita metody 23,5%.

PROCEDURA ANALITYCZNA

Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej, HPLC

1. Zakres stosowania metody

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości fenylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie fenylohydrazyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 2 mg/m³.

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 absorpcji fenylohydrazyny w roztworze kwasu chlorowodorowego o stężeniu 0,1 mol/l, wywołaniu reakcji fenylohydrazyny

z acetonem i chromatograficznym oznaczeniu powstałej pochodnej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem detektora spektrofotometrycznego.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

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

4.2. Dokładność ważenia

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

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji wzorcowych, 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 unieszkodliwianiem.

4.4. Wzorcowanie

Z uwagi na nietrwałość fenylohydrazyny (utlenianie) do przygotowywania roztworów wzorcowych należy stosować chlorowoderek fenylohydrazyny.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Aceton do HPLC

Stosować według punktu 4.

5.2. Metanol do HPLC

Stosować według punktu 4.

5.3. Fenylohydrazyna

Stosować według punktu 4.

5.4. Kwas chlorowodorowy

Stosować według punktu 4.

5.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego

Przygotować roztwór kwasu chlorowodorowego o stężeniu 0,1 mol/l.

5.6. Roztwór wzorcowy podstawowy fenylohydrazyny

Odważyć dokładnie 5,35 mg chlorowodoru fenylohydrazyny wg punktu 5.1., przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml i rozpuścić w roztworze kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. W 1 ml tak przygotowanego roztworu znajduje się 0,16 mg fenylohydrazyny.

5.7. Roztwory wzorcowe robocze fenylohydrazyny

Do sześciu kolb pomiarowych o pojemności 10 ml odmierzyć odpowiednio, w mililitrach: 0; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 5.6 i uzupełnić do kreski roztworem kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. Stężenia fenylohydrazyny w tak przygotowanych roztworach wynoszą odpowiednio: 0,0; 0,008; 0,016; 0,04; 0,08 i 0,16 mg/ml.

5.8. Woda o czystości do HPLC

Stosować według punktu 4.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie oznaczeń przy długości fali 270 nm.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną stalową o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm wypełnioną żelazem krzemionkowym modyfikowanym fazą pentafluorofenylopropylową o średnicy ziaren 5 μ m.

6.3. Kolby pomiarowe

Stosować kolby pomiarowe o pojemności 10 i 25 ml.

6.4. Pipety szklane

Stosować pipety szklane jednomiarowe o pojemności: 0,5; 1; 2,5 i 5 ml.

6.5. Płuczki

Stosować płuczki bełkotkowe ze szkłem spiekającym o pojemności 50 ml.

6.6. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą z przepływomierzem, umożliwiającą pobieranie powietrza ze stałym strumieniem objętości według punktu 7.

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-07. Za pomocą pompy wg punktu 6.6. przepuścić przez płuczki wg punktu 6.5. zawierające 15 ml roztworu kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. około 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości do 1 l/min. Pobrane próbki powietrza należy zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe przez dziesięć dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywne oznaczanie fenylohydrazyny od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.2. oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako warunki przykładowe.

W przypadku współwystępowania substancji interferujących (pochodne fenylohydrazyny) należy tak dobrać warunki rozdzielności chromatograficznej, by zapewnić selektywne oznaczenie fenylohydrazyny.

Tabela 1.**Warunki pracy chromatografu cieczowego**

Kolumna	Discovery HS-F5 250 x 2,1 mm ziarno 5 µm
Faza ruchoma	metanol (A): woda (B)
Program – izokratycznie	70 : 30
Strumień objętości	0,2 ml/min
Objętość próbki	10 µl
Temperatura kolumny	25 °C
Długość fali analitycznej	λ – 270 nm

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do kolb z roztworami wzorcowymi roboczymi fenylohydrazyny dodać po 20 µl acetonu wg punktu 5.1., wymieszać i odstawić na 2 h. Po tym czasie roztwory poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość fenylohydrazyny w roztworze, a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni (wysokości) piku tego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczania

Zawartość płuczek przenieść do kolb pomiarowych o pojemności 25 ml. Każdą płuczkę przepłukać dwukrotnie 3 ml wody destylowanej i dodać do roztworu pochłaniającego. Kolby uzupełnić do kreski roztworem 0,1 mol/l kwasu chlorowodorowego wg punktu 5.5. i wymieszać. Do kolb dodać po 20 µl acetonu i odstawić na 2 h. Po tym czasie część roztworów przenieść do wialek o pojem-

ności 2 ml i poddać analizie chromatograficznej. W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtarne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie należy uwzględnić w obliczeniach. Powstałe fenylohydrazony acetonu nie są substancjami trwałymi. Po dodaniu acetonu wszystkie próbki muszą zostać poddane analizie jak najszybciej po osiągnięciu maksimum reakcji.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie fenylohydrazyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

- c – zawartość fenylohydrazyny odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując chromatograf cieczowy firmy Waters model Alliance wyposażony w pompę poczwórną, automatyczny dozownik próbek, detektor spektrofotometryczny oraz kolumnę analityczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,008 ÷ 0,16 mg/ml
2 ÷ 40 mg/m³ (dla próbki powietrza o objętości 100 l)
- granica oznaczania ilościowego, X_{ozn} 0,4 µg/ml (UV-VIS)

- granica wykrywalności 0,12 µg/ml (UV-VIS)
- współczynnik korelacji charakteryzujący liniowość krzywych wzorcowych, r 0,999
- całkowita precyzja badania, V_c 6,3%
- niepewność całkowita metody 15%.