Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 2025, nr 2(124), s. 141–156 DOI: 10.54215/PiMOSP/5.124.2025
Nadesłano: 15.04.2025 r.
Przyjęto do druku: 22.05.2025 r.
https://www.ciop.pl/pimosp_strona PRACA ORYGINALNA

Oznaczanie metylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną[1]

Determination of methylhydrazine in workplace air with high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection

MARZENA BONCZAROWSKA
https://orcid.org/0000-0003-3612-0656
e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl
WIOLETTA MYSUR
AGATA CIEMCIOCH
SŁAWOMIR BRZEŹNICKI
https://orcid.org/0000-0002-0542-8538

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi
Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

Numer CAS: 60-34-4

Streszczenie

Metylohydrazyna (MH) w temperaturze pokojowej jest bezbarwną cieczą o charakterystycznym zapachu amoniaku. Stosuje się ją głównie jako składnik paliw rakietowych i paliw do silników odrzutowych. Jest również wykorzystywana w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym jako silny reduktor, środek antykorozyjny i komponent do syntezy leków. MH jest podejrzewana o działanie mutagenne, genotoksyczne i rakotwórcze (nowotwory wątroby, płuc, nadnerczy). Narażenie na MH może powodować zmiany w obrębie błony śluzowej nosa i oczu oraz podrażnienia skóry. Celem pracy było przygotowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania metylohydrazyny w powietrzu na stanowiskach pracy, która umożliwi pomiar stężenia tego związku, a następnie pozwoli na dokonanie oceny narażenia zawodowego. Metoda polega na zatrzymaniu MH na filtrze z włókna szklanego impregnowanego roztworem kwasu siarkowego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny diwodorofosforanu sodu i wersenianu disodu z dodatkiem kwasu fosforowego, derywatyzacji wyekstrahowanego związku w reakcji z aldehydem benzoesowym i chromatograficznym oznaczeniu powstałej pochodnej techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS). Zaproponowany sposób pobierania próbek i ekstrakcji MH z filtrów umożliwia wysoki odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość wydajności ekstrakcji wynosi 101,7%. Zależność wskazań detektora UV-VIS w funkcji stężeń MH ma charakter liniowy (r = 0,9989) w zakresie stężeń 0,36 ÷ 7,2 μg/ml. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania normy PN-EN 482:2021-08 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda oznaczania MH 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: metylohydrazyna, metoda analityczna, metoda chromatografii cieczowej, detekcja spektrofotometryczna, powietrze na stanowiskach pracy, narażenie zawodowe.

[1] Zrealizowano na podstawie wyników VI etapu programu wieloletniego pn. „Rządowy Program Poprawy Bezpieczeństwa i Warunków Pracy", finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr III.PN.02 pt. „Opracowanie 9 nowych metod oznaczania szkodliwych substancji chemicznych dla potrzeb oceny środowiska pracy". Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Abstract

Methylhydrazine (MH) at room temperature is a colourless liquid with a characteristic ammonia odor. It is mainly used as an ingredient in rocket and jet fuels. It is also used in the chemical and pharmaceutical industries as a strong reducing agent, corrosion inhibitor and component for drug synthesis. MH is suspected to have mutagenic, genotoxic and carcinogenic effects on liver, lung, adrenal gland tumours. Exposure to MH can cause nasal and ocular mucosal lesions and skin irritation. The aim of this study was to prepare a suitably sensitive and selective method for determining methylhydrazine in workplace air, which will enable the concentration of this compound to be measured and then allow occupational exposure to be assessed. The method consists in the retention of MH on a glass fiber filter impregnated with sulphuric acid solution, extraction of the filter with a mixture of sodium dihydrogen phosphate and disodium edetate with the addition of phosphoric acid, derivatisation of the extracted compound in the reaction with benzoic aldehyde and chromatographic determination of the resulting derivative using the technique of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (UV-VIS). The proposed sampling and extraction of MH from the filters allows high analyte recovery. The average (for the three concentrations) extraction efficiency value is 101.7%. The dependence of UV-VIS detector readings as a function of MH concentration is linear (r=0.9989) in the concentration range from 0.36 µg/ml to 7.2 µg/ml. The method is precise, accurate and it meets the criteria of EN 482:2021-08 for procedures for determining chemical agents. The developed method for determining MH in workplace air has been written in the form of an analytical procedure, which is included in the Appendix. This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

Keywords: methylhydrazine, analytical method, liquid chromatography method, spectrophotometric detection, air at workplaces, occupational exposure.

Adres do korespondencji/Contact details: Marzena Bonczarowska, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera, 91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl

WPROWADZENIE

Charakterystyka substancji

Metylohydrazyna (MH) w temperaturze pokojowej jest bezbarwną cieczą o charakterystycznym zapachu amoniaku. W obecności utleniaczy może powodować samozapłon. Jest stosowana głównie jako składnik paliw rakietowych i paliw do silników odrzutowych. Wykorzystuje się ją również w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym jako silny reduktor, środek antykorozyjny i komponent do syntezy leków. Narażenie na MH może powodować zmiany w obrębie błony śluzowej nosa (PubChem 2025; *Starek* 2000).

W badaniach toksyczności ostrej obserwowano negatywne objawy ze strony układu oddechowego, pokarmowego, wydalniczego i nerwowego, a także podrażnienia skóry i błon śluzowych nosa i oczu. Badania toksyczności przewlekłej i podprzewlekłej na zwierzętach wykazały głównie zaburzenia hematologiczne polegające na obniżeniu liczby erytrocytów, hematokrytu i hemoglobiny, jak również zwiększenie stężeń methemoglobiny i liczby ciałek Heinza (ChemPył 2025; *Starek* 2000).

MH podejrzewana jest także o działanie mutagenne, genotoksyczne i rakotwórcze (nowotwory wątroby, płuc, nadnerczy), (*Klimczak, Kilanowicz* 2024; PubChem 2025). Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r., w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin metylohydrazyna została zaklasyfikowana jako substancja rakotwórcza (Carc. 1B) z przypisanym zwrotem H350: „Może powodować raka".

W Polsce od 1998 r. (Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Socjalnej… 1998) obowiązują wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) i najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) dla MH wynoszące odpowiednio 0,02 mg/m^3 i 0,1 mg/m^3. Zespół Ekspertów Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Stężeń i Natężeń na posiedzeniu w dniu 26 września 2024 r. na podstawie dostępnych danych toksykologicznych rekomendował pozostawienie wartości NDS dla MH na niezmienionym poziomie przy jednoczesnym wycofaniu wartości NDSCh.

Opisana w Polskiej Normie PN-Z-04148-4:2000 (norma wycofana) metoda oznaczania tego związku w powietrzu w środowisku pracy umożliwia oznaczenie stężenia MH na poziomie 0,01 mg/m^3, czyli na poziomie 1/2 wartości NDS, i nie spełnia obowiązujących obecnie wymagań dla metod oznaczania szkodliwych substancji chemicznych w środowisku pracy (PN-EN 482).

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czułej metody oznaczania MH w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary stężenia tego związku zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482 i ocenę narażenia zawodowego.

Założenia opracowanej metody

Do oznaczania metylohydrazyny w powietrzu stosuje się technikę spektrofotometrii w świetle widzialnym (*Kosyakov* i in. 2017; NIOSH 1994; *Wróblewska-Jakubowska* 1997), elektroforezy kapilarnej (*You* i in. 1999) lub metody chromatograficzne z różnymi systemami detekcji, takimi jak spektrofotometria (*Bonczarowska* i in. 2019; *Kossyakov* i in. 2017; *Timchenko* i in. 2021a; *Zieliński* i in. 2020), techniki elektrochemiczne (*An* i in. 2014; *Fiala, Kulakis* 1981; *Smolenkov* i in. 2005; *Zhou, Wang* 1993) oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (*Fortin, Chen* 2010).

Z uwagi na brak grup chromoforowych w cząsteczce metylohydrazyny zastosowanie w analizie techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub metod spektrofotometrycznych wymaga przeprowadzenia badanego związku w pochodną przy zastosowaniu alifatycznych lub aromatycznych aldehydów, takich jak np.: benzaldehyd, 5-nitro-2-furaldehyd, aldehyd 2-naftalenowy, zapewniających stabilność powstałych hydrazonów.

Metody chromatograficzne umożliwiają ponadto separację oznaczanych substancji w przypadku możliwego współwystępowania w danym środowisku innych związków o podobnym charakterze. Z tego względu zdecydowano o zastosowaniu do opracowania metody oznaczania MH techniki HPLC w połączeniu z detekcją spektrofotometryczną.

Na podstawie przeglądu literatury stwierdzono, że oznaczanie związków z grupy hydrazyn z wykorzystaniem techniki HPLC jest możliwe przy zastosowaniu powszechnie stosowanych kolumn analitycznych wypełnionych złożem typu C-18 (*Bonczarowska* i in. 2019; *Dobrzyńska* 2007; *Timchenko* i in. 2021a; 2021b; *Zieliński* i in. 2020).

Do pobierania próbek powietrza (podobnie jak podczas oznaczania hydrazyny i innych pochodnych tego związku), (*Bonczarowska* i in. 2019; *Dobrzyńska* 2007; *Zieliński* i in. 2020) zastosowano filtry wykonane z włókna szklanego pokryte roztworem kwasu siarkowego.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Przy opracowaniu metody oznaczania metylohydrazyny (MH) w powietrzu przyjęto następujące założenia:

- pobór jednej próbki na zmianę roboczą
- objętość pobranego powietrza 360 l
- zakres pomiarowy 0,72 ÷ 14,4 µg/filtr (0,36 ÷ 7,2 µg/ml), co dla próbki powietrza 360 l i 2 ml roztworu użytego do ekstrakcji odpowiada zakresowi 0,002 ÷ 0,04 mg/m^3 (1/10 ÷ 2 NDS).

Aparatura, materiały i odczynniki

Do badań stosowano następującą aparaturę analityczną: aspiratory indywidualne GilAir 3 umożliwiające pobieranie próbek powietrza w strefie oddychania pracownika ze stałym strumieniem objętości 60 l/h, głowice do poboru próbek powietrza, chromatograf cieczowy firmy Waters Acquity Arc LC System wyposażony w poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, detektor spektrofotometryczny Waters 2489, termostat kolumny analitycznej, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i akwizycji danych, kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 250 mm × × 3 mm wypełnioną złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 µm, mieszadło mechaniczne, wagę analityczną, inkubator.

Ponadto stosowano: naczynka szklane o pojemności 2 ml i 4 ml, kolby miarowe o pojemności: 1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml i 1000 ml, pipety automatyczne nastawne o pojemności: 0,01 ÷ 0,1 ml; 0,1 ÷ 1 ml i 0,5 ÷ 5 ml, filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy 13 mm i średnicy porów 0,45 µm, filtry z włókna szklanego (prod. Whatman GF/A) o średnicy 25 mm i wielkości porów 1,6 µm.

Zastosowane w badaniach odczynniki i roztwory to: acetonitryl (ACN) o czystości do HPLC (prod. J.T. Baker), aldehyd benzoesowy (prod. Merck), diwodorofosforan sodu (prod. Avantor), kwas fosforowy(V) (prod. Fluka), kwas siarkowy(VI) (prod. Chempur), siarczan metylohydrazyny (prod. TCI), wersenian disodu (0,05 mol/l roztwór mianowany), (prod. Avantor), woda destylowana o czystości do HPLC, roztwór do ekstrakcji filtrów: mieszanina 0,1 mol/l diwodorofosforanu sodu, 0,05 mol wersenianu disodu z dodatkiem kwasu fosforowego(V), roztwór do derywatyzacji sporządzony przez rozpuszczenie 50 µl aldehydu benzoesowego w 50 ml acetonitrylu (roztwór 0,1-procentowy).

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej techniką HPLC-UV-VIS

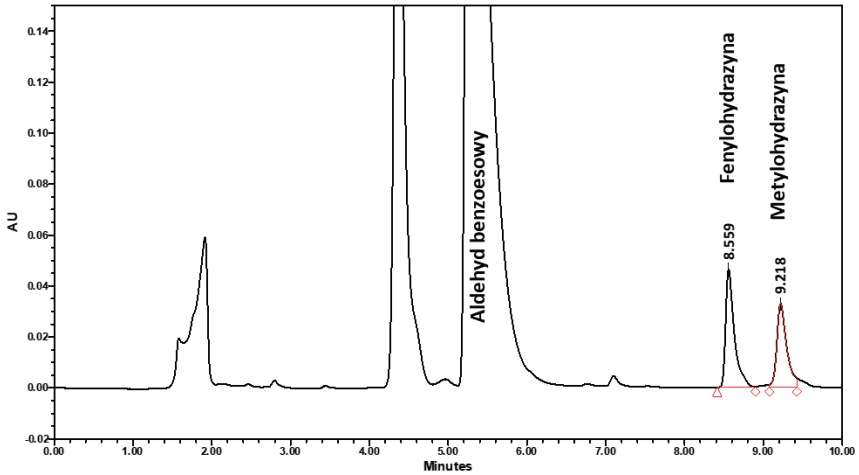
Badania dotyczące doboru optymalnych warunków analizy MH przeprowadzono z zastosowaniem kolumny Supelcosil LC-18 o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm, wypełnionej złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 µm, eluowanej mieszaniną wody i acetonitrylu o zmiennym składzie (elucja gradientowa). Długość fali analitycznej stosowanej w oznaczeniach (282 nm) przyjęto na podstawie danych literaturowych (*Timchenko* i in. 2021a).

W celu sprawdzenia możliwości selektywnego oznaczenia MH przygotowano mieszaninę siarczanu metylohydrazyny i fenylohydrazyny w acetonitrylu, którą naniesiono (0,1 ml) na filtr szklany nasączony roztworem kwasu siarkowego. Po wysuszeniu filtr przeniesiono do naczynka o pojemności 4 ml, dodano 2 ml roztworu do ekstrakcji i poddano ekstrakcji (30 min) przy użyciu mieszadła mechanicznego. Po oczyszczeniu ekstraktu za pomocą filtrów strzykawkowych (membrana PTFE, średnica porów 0,45 µm) do naczynek o pojemności 2 ml przeniesiono po 1 ml ekstraktu, dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji i po dokładnym wymieszaniu próbki umieszczono na 30 min w inkubatorze w temperaturze 50°C. Po ochłodzeniu próbek do temperatury pokojowej próbki poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że opracowane parametry analizy chromatograficznej pozwalają na selektywne oznaczenie metylohydrazyny w obecności innych substancji o podobnym charakterze. Optymalne warunki pracy zestawu HPLC-UV-VIS stosowanego podczas opracowywania metody podano w tabeli 1, a przykładowy chromatogram mieszaniny pochodnych badanego związku i fenylohydrazyny przedstawiono na rycinie 1.

Tabela 1. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS
Table 1. Working conditions of a liquid chromatograph and UV-VIS detector

Kolumna analityczna	Supelcosil LC-18 25 cm × 3 mm		
Faza ruchoma		woda A	acetonitryl B
Program – gradient (*v. v*)	0 min	55%	45%
	1 min	55%	45%
	4 min	25%	75%
	7 min	25%	75%
	7,5 min	55%	45%
	11 min	55%	45%
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,5 ml/min		
Temperatura kolumny	30°C		
Objętość próbki	5 µl		
Detektor UV-VIS o długości fali λ	282 nm		



Rycina 1. Chromatogram mieszaniny pochodnych fenylohydrazyny (czas retencji 8,559 min) i metylohydrazyny (czas retencji 9,218 min). Detektor UV-VIS, λ = 282 nm
Figure 1. Chromatogram of a mixture of phenylhydrazine (retention time 8.559 min) and methylhydrazine (retention time 9.218 min). UV-VIS detector, λ=282 nm

Badanie wpływu czasu i temperatury na szybkość reakcji MH z aldehydem benzoesowym

W celu ustalenia optymalnych warunków temperatury i czasu reakcji MH z aldehydem benzoesowym przygotowano w roztworze ekstrakcyjnym po sześć roztworów MH o stężeniach: 0,36 µg/ml; 2,88 µg/ml i 7,2 µg/ml. Do każdego roztworu dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji. Po trzy próbki z każdego stężenia pozostawiono w temperaturze pokojowej i poddano analizie chromatograficznej po 30 min i powtórnie po upływie 3 h od dodania aldehydu benzoesowego. Kolejne trzy próbki z każdego stężenia inkubowano przez 30 min w temperaturze 50°C i analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji, a następnie ponownie po upływie 3 h.

Wyniki badania dotyczącego uzyskania optymalnych warunków reakcji metylohydrazyny z aldehydem benzoesowym przedstawiono w tabeli 2. Wyniki te wskazują, że temperatura reakcji w istotny sposób wpływa na uzyskanie optymalnej wydajności reakcji oraz na stabilność próbek. Inkubacja próbek w temperaturze 50°C pozwala na uzyskanie stabilnej pochodnej już po 30 min, podczas gdy w temperaturze pokojowej nie jest możliwe osiągnięcie pełnej wydajności reakcji nawet po upływie 180 min.

Badanie zakresu stosowania i liniowości metody analitycznej

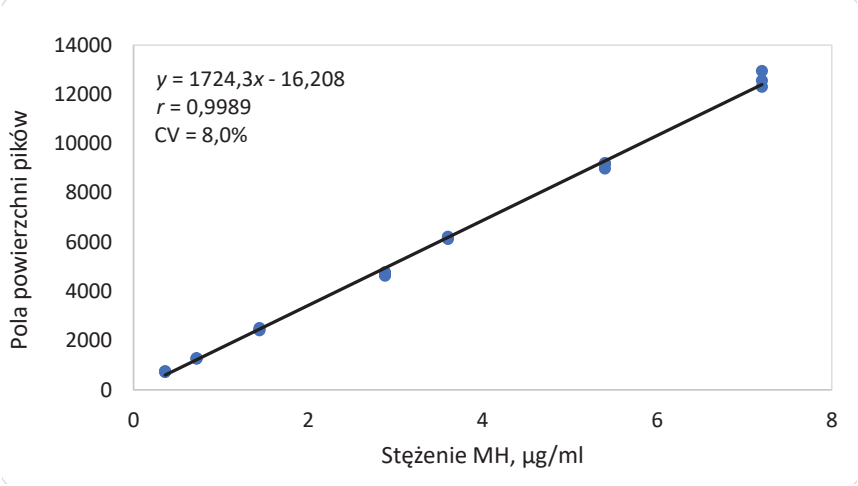
W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania MH przygotowano roztwory wzorcowe z soli metylohydrazyny w przeliczeniu na czysty związek. Na trzy serie po osiem filtrów z włókna szklanego impregnowanego roztworem kwasu siarkowego o stężeniu 0,3 mol/l naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych MH w acetonitrylu o stężeniach: 7,2 µg/ml; 14,4 µg/ml; 28,8 µg/ml; 57,6 µg/ml; 72 µg/ml; 108 µg/ml i 144 µg/ml. Na ósmy filtr jako ślepą próbkę naniesiono 0,1 ml acetonitrylu. Po dokładnym odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek o pojemności 4 ml, dodano 2 ml roztworu do ekstrakcji i poddano 30-minutowemu wymywaniu przy użyciu mieszadła mechanicznego. Po oczyszczeniu ekstraktów za pomocą filtrów strzykawkowych (membrana PTFE, średnica porów 0,45 µm) do naczynek o pojemności 2 ml przeniesiono po 1 ml ekstraktu, dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji (0,1-procentowy aldehyd benzoesowy w acetonitrylu) i po dokładnym wymieszaniu próbki umieszczono w inkubatorze w temperaturze 50°C. Zawartość MH w 1 ml tak przygotowanych roztworów wynosiła: 0,36 µg; 0,72 µg; 1,44 µg; 2,88 µg; 3,6 µg; 5,4 µg; 7,2 µg oraz 0 µg w ślepej próbce. Po ochłodzeniu próbek do temperatury pokojowej roztwory poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody w badanym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 3 i graficznie na rycinie 2. Z przedstawionych danych wynika, że zależność odpowiedzi detektora od stężenia metylohydrazyny ma charakter liniowy w zakresie 0,72 ÷ 14,4 µg/filtr (0,36 ÷ 7,2 µg/ml), co dla próbki powietrza 360 l odpowiada zakresowi 0,002 ÷ 0,04 mg/m^3 (1/10 ÷ 2 NDS). Zależność tę opisuje równanie $y = 1724{,}3x - 16{,}208$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) dla trzech serii kalibracyjnych wynosi 8%, a współczynnik regresji $r = 0{,}999$.

Tabela 2. Wpływ czasu i temperatury na wydajność reakcji metylohydrazyny z aldehydem benzoesowym
Table 2. Impact of time and temperature on the efficiency of the reaction of methylhydrazine with benzaldehyde

Stężenie MH w roztworze, µg/ml		0,36		2,88		7,2	
Czas, min		30	180	30	180	30	180
Pole powierzchni piku	temperatura pokojowa	– *	180 299 310	393 761 1155	3081 3407 3498	3055 6677 5488	13 678 13 963 14 027
	inkubacja 30 min w temp. 50°C	452 571 617	494 582 607	4046 4085 4115	4132 4060 4147	12 978 13 184 14 331	13 181 13 867 14 147

Objaśnienie:
* brak piku oznaczanej substancji.



Rycina 2. Krzywa wzorcowa MH w zakresie stężeń 0,36 ÷ 7,2 µg/ml. Detektor UV-VIS, λ = 282 nm
Figure 2. Calibration curve for MH in the range 0.36–7.2 µg/ml. UV-VIS detector, λ=282 nm

Tabela 3. Wyniki wzorcowania MH na filtrach z włókna szklanego nasączonych kwasem siarkowym
Table 3. Linearity testing of MH on glass fiber filters coated with sulfuric acid

Stężenie MH, µg/ml	0,36	0,72	1,44	2,88	3,6	5,4	7,2
Pole powierzchni piku (PPP)	734 760 756	1285 1276 1291	2455 2514 2428	4646 4781 4698	6135 6221 6199	8997 9215 9171	12 311 12 569 12 955
Średnia PPP	750,0	1284,0	2465,7	4708,3	6185,0	9127,7	12 611,7
Odchylenie standardowe, SD	14,0	7,5	44,0	68,1	44,7	115,3	324,1
Współczynnik zmienności, CV, %	1,9	0,6	1,8	1,4	0,7	1,3	2,6

Badanie warunków pobierania próbek powietrza

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na zatrzymanie MH pobranej na impregnowany roztworem kwasu siarkowego filtr z włókna szklanego przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych o stężeniach MH: 7,2 µg/ml; 57,6 µg/ml i 144 µg/ml, odpowiadających zakresowi badanej metody 1/10 ÷ 2 wartości NDS. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w głowicach do pobierania próbek powietrza. Za pomocą aspiratorów indywidualnych przez filtry przepuszczono 360 l 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 2 ml roztworu do ekstrakcji oraz mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE, a następnie z każdego roztworu do naczynek 2-mililitrowych przeniesiono po 1 ml ekstraktu, dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji i po dokładnym wymieszaniu umieszczono próbki na 30 min w inkubatorze w temperaturze 50°C. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej roztwory poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów z filtrów, na które naniesiono roztwory wzorcowe MH o takich samych stężeniach, ale przez które nie przepuszczano powietrza. Roztwory kontrolne poddano takiej samej procedurze analitycznej jak próbki badane.

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza przedstawiono w tabeli 4. Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analitu. Średnie wartości wydajności ekstrakcji MH z filtrów z włókna szklanego nasączonych roztworem kwasu siarkowego, przez które przepuszczono 360 l powietrza, dla trzech analizowanych zawartości MH na filtrze (0,72 µg; 5,7 µg i 14,4 µg) wynoszą odpowiednio: 101,4% (SD-7,3); 97,8% (SD-4,6) i 105,8% (SD-6,4). Średnia dla trzech stężeń wartość współczynnika wydajności ekstrakcji wynosi 101,7% (SD-6,7).

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności metody

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

Przygotowano dwadzieścia roztworów MH o stężeniu 0,18 µg/ml, do których dodano po 0,5 ml roztworu do derywatyzacji, i po dokładnym wymieszaniu próbki umieszczono na 30 min w inkubatorze w temperaturze 50°C. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej roztwory poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki analizy dotyczącej wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności MH z zastosowaniem techniki HPLC-UV-VIS przedstawiono w tabeli 5. Obliczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe pól powierzchni pików uzyskanych z analizy dwudziestu roztworów MH o stężeniu 0,18 µg/ml. Uwzględniając współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej, obliczono granicę wykrywalności (LOD) i granicę oznaczania ilościowego (LOQ) metody. Obliczone wartości wynoszą odpowiednio: 0,092 µg/ml i 0,306 µg/ml.

Tabela 4. Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń MH na filtrach impregnowanych roztworem kwasu siarkowego (0,3 mol/l)

Table 4. Investigation of air sampling conditions for MH determinations on glass fiber filters coated with sulphuric acid (0,3 M/l)

Masa MH, µg/filtr	Pole powierzchni piku		Wydajności ekstrakcji, %	Średnia wartość wydajności ekstrakcji, %
	roztwór kontrolny (bez przepuszczania powietrza)	roztwór po desorpcji (po przepuszczeniu 360 l powietrza)		
0,72	942 975 931	1097 947 955 937 892 947	115,6 99,8 100,6 98,7 94,0 99,8 SD 7,3 CV 7,2%	101,4
5,76	4145 4196 4158	4160 4193 4148 3713 4226 4001	99,8 100,6 99,6 89,1 101,4 96,0 SD 4,6 CV 4,7%	97,8
14,4	12 149 12 111 12 754	12 954 13 193 12 131 12 583 12 981 14 486	105,0 106,9 98,3 102,0 105,2 117,4 SD 6,4 CV 6,1%	105,8
Średni współczynnik odzysku, Śr, % Odchylenie standardowe, SD Współczynnik zmienności, CV, %			101,7 6,8 6,7	

Tabela 5. Wyznaczanie granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ)
Table 5. Determination of the detection (LOD) and quantification limit (LOQ)

Wartości sygnału	528 471 623 614 566 617 491 524 539 538	617 625 533 616 559 634 634 529 642 550
Średnie pole powierzchni, *n* = 20	572,5	
Odchylenie standardowe, S	52,84	
Współczynnik zmienności, CV, %	9,23	
Granica wykrywalności (LOD), µg/ml	0,092	
Granica oznaczalności (LOQ), µg/ml	0,306	

Badanie precyzji metody oznaczania MH w powietrzu

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano trzy serie po dziesięć filtrów szklanych nasączonych roztworem kwasu siarkowego, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych MH o stężeniach odpowiadających zakresowi badanej metody 1/10 ÷ 2 wartości NDS, czyli 7,2 µg/ml; 57,6 µg/ml i 144 µg/ml. Po 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml mieszaniny ekstrakcyjnej i mieszadła mechanicznego uzyskane ekstrakty przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE, a następnie z każdego ekstraktu przeniesiono po 1 ml roztworu do naczynek o pojemności 2 ml, dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji i po dokładnym wymieszaniu próbki umieszczono na 30 min w inkubatorze w temperaturze 50°C. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej próbki poddano analizie chromatograficznej.

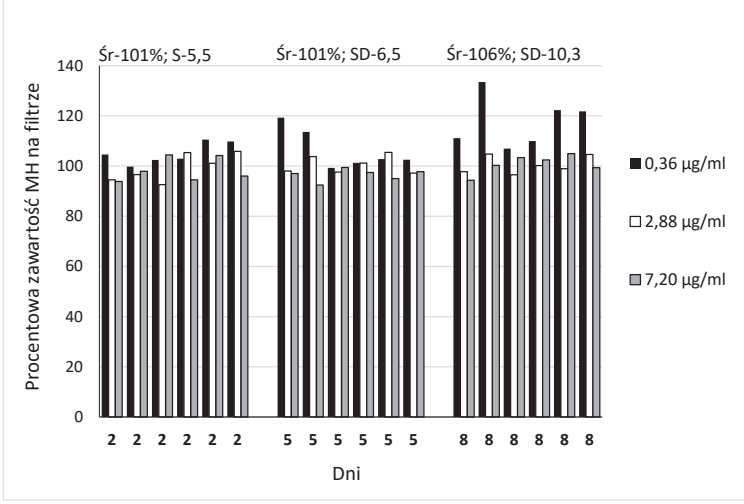
Wyniki badań precyzji oznaczeń MH przedstawiono w tabeli 6. Wskazują one, że założone warunki wykonania analizy pozwalają na precyzyjne wykonanie oznaczeń stężeń MH w powietrzu. Wartości średnie oznaczonych stężeń MH oraz współczynniki zmienności (CV) rozrzutów uzyskanych wyników dla stężeń: 0,36 µg/ml; 2,88 µg/ml i 7,2 µg/ml wynoszą odpowiednio: 0,45 (CV 3,6%); 2,45 (CV 3,1%) i 7,48 (CV 6,2%).

Badanie trwałości próbek MH pobranych na filtry z włókna szklanego

W celu zbadania trwałości pobranych na filtry próbek powietrza zawierającego MH przygotowano trzy serie po osiemnaście filtrów szklanych nasączonych roztworem kwasu siarkowego, na które naniesiono po 0,1 ml roztworów wzorcowych MH o stężeniach: 7,2 µg/ml; 57,6 µg/ml i 144 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml, szczelnie zamknięto i przechowywano w temperaturze 4°C. Po 2, 5 i 8 dniach przechowywania przeprowadzono analizę sześciu filtrów z każdego stężenia. Do naczynek z filtrami dodano po 2 ml roztworu mieszaniny do ekstrakcji, a następnie poddano je 30-minutowemu wymywaniu za pomocą mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE, po czym z każdego roztworu przeniesiono po 1 ml ekstraktu do naczynek o pojemności 2 ml, dodano 0,5 ml roztworu do derywatyzacji i po dokładnym wymieszaniu próbki umieszczono na 30 min w inkubatorze w temperaturze 50°C. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej próbki poddano analizie chromatograficznej. Wartości pól powierzchni pików badanego związku z uzyskanych ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców MH o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Tabela 6. Wyniki badania precyzji metody oznaczania MH
Table 6. Results of the precision study of the method for determining MH

Numer analizy	Stężenie MH, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1	0,36	0,41	2,88	2,45	7,2	6,62
2		0,40		2,37		7,58
3		0,43		2,39		6,93
4		0,44		2,60		6,91
4		0,43		2,51		7,06
6		0,41		2,42		6,75
7		0,40		2,42		6,47
8		0,42		2,38		7,78
9		0,40		2,54		7,27
10		0,42		2,42		6,60
Średnia	0,42		2,45		7,00	
SD	0,01		0,08		0,43	
CV, %	3,57		3,11		6,16	



Rycina 3. Badanie trwałości próbek MH przechowywanych w chłodziarce
Figure 3. Studies of the persistence of MH samples stored in a refrigerator

Wyniki badań warunków przechowywania pobranych próbek MH przedstawiono na rycinie 3. Wyniki wykonanych badań wskazują, że próbki MH pobrane na filtry z włókna szklanego nasączone roztworem kwasu siarkowego przechowywane w chłodziarce są trwałe przez okres 5 dni. Po 8 dniach przechowywania w zakresie niskich stężeń (1/10 NDS) zaobserwowano relatywnie duży rozrzut wyników uzyskanych współczynników wydajności ekstrakcji w zakresie 107,0 ÷ 133,5% (SD-10,1), co może świadczyć o niestabilności pobranych próbek. W przypadku krótszego okresu przechowywania (5 dni) średnie wartości współczynnika wydajności ekstrakcji dla poszczególnych stężeń MH na filtrze (0,72 µg/filtr; 5,76 µg/filtr; 14,4 µg/filtr) wynoszą odpowiednio: 106,4% (SD-8,0); 100,5% (SD-3,5) i 96,5% (SD-2,5), a średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika wydajności ekstrakcji MH po tym czasie wynosi 101,2% (SD-6,5).

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482:2021-08. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,36 ÷ 7,2 µg/ml (0,002 ÷ 0,04 mg/m^3 dla próbki powietrza 360 l i 2 ml roztworu użytego do ekstrakcji)
- granica wykrywalności 0,092 µg/ml
- granica oznaczalności 0,306 µg/ml

- współczynnik korelacji $r = 0{,}9989$
- niepewność rozszerzona metody 19,7%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania metylohydrazyny (MH) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Wskazania detektora spektrofotometrycznego w funkcji stężenia MH w badanym zakresie stężeń (0,36 ÷ 7,2 μg/ml) mają charakter liniowy. Próbki powietrza do oznaczeń MH można pobierać, stosując filtry z włókna szklanego nasączone roztworem kwasu siarkowego. Zatrzymany na filtrze związek należy ekstrahować mieszaniną 0,1 mol/l diwodorofosforanu sodu i 0,05 mol wersenianu disodu z dodatkiem kwasu fosforowego. Próbki pobrane na filtry przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez 5 dni. Metoda, w wersji przedstawionej w załączniku, umożliwia oznaczanie MH w powietrzu na stanowiskach pracy w stężeniach od 0,002 mg/m^3, czyli 0,1 obowiązującej wartości NDS.

Zaproponowana metodyka jest specyficzna wobec fenylohydrazyny.

PIŚMIENNICTWO

An Z., Li P., Zhang X. i in. (2014). Simultaneous determination of hydrazine, methylhydrazine, and 1,1-dimethylhydrazine in rat plasma by LC–MS/MS. J. Liq. Chromatogr. R. T. 37(9), 1212–1225. DOI: 10.1080/10826076.2012.745147.

Bonczarowska M., Piątek P., Brzeźnicki S. (2019). Hydrazyna. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 1(99), 61–76. DOI: 10.5604/01.3001.0013.0804.

ChemPył (2025). Baza wiedzy o zagrożeniach chemicznych i pyłowych. Metylohydrazyna. https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/appmanager/ciop/pl?_nfpb=true&_pageLabel=P27600224401410431343241&id_czynn_chem=3752025 [dostęp: 15.04.2025].

Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 3(25), 5–14.

Dobrzyńska E. (2007). Hydrazyna – metoda oznaczania. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 4(54), 63–68.

Fiala E.S., Kulakis C. (1981). Separation of hydrazine, monomethylhydrazine, 1,1-dimethylhydrazine and 1,2-dimethylhydrazine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. A 214(2), 229–233. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)98529-7.

Fortin D.T., Chen R. (2010). Developing a trace level GC–MS method for detecting methylhydrazine in an experimental drug substance. J. Chromatogr. Sci. 48(4), 299–302. DOI: 10.1093/chromsci/48.4.299.

Klimczak M., Kilanowicz A. (2024). Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. Metylohydrazyna [praca nieopublikowana].

Kosyakov D.S., Amosov A.S., Ul'yanovskii N.V. i in. (2017). Spectrophotometric determination of hydrazine, methylhydrazine, and 1,1-dimethylhydrazine with preliminary derivatization by 5-nitro-2-ruraldehyde. J. Anal. Chem. 72(2), 171–177. DOI: 10.1134/S106193481702006X.

NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health (1994). Monomethylhydrazine method #3510. NIOSH Manual of Analytical Methods, 4th ed., https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/3510.pdf [dostęp: 15.04.2025].

PN-EN 482:2021-08 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężenia czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur.

PN-Z-04148-4:2000 Ochrona czystości powietrza – Badania zawartości hydrazyny i jej pochodnych – Oznaczanie metylohydrazyny na stanowiskach pracy metodą spektrofotometryczną.

PubChem (2025). National Library of Medicine. Methylhydrazine. Compound summary https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylhydrazine#section=2D-Structure [dostęp: 15.04.2025].

Smolenkov A.D., Krechetov P.P., Pirogov A.V. i in. (2005). Ion chromatography as a tool for the investigation of unsymmetrical hydrazine degradation in soils. Int. J. Environ. Anal. Chem. 85(14), 1089–1100. DOI: 10.1080/03067310500191454.

Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Socjalnej z dnia 17 czerwca 1998 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 1998 Nr 79, poz. 513.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. UE L 353 z 31.12.2008.

Starek A. (2000). Metylohydrazyna – dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 2(24) 23–32.

Timchenko Y.V., Apenkina A.V., Smolenkov A.D. i in. (2021a). Simultaneous determination of hydrazine, metylhydrazine and 1,1-mimethylhydrazine in waters by HPLC with spectrophotometric detection using catalysis to obtain derivatives. J. Anal. Chem. 76(10), 1163–1171. DOI: 10.1134/S1061934821100117.

Timchenko Y.V., Stavrianidi A.N,, Smolenkov A.D. i in. (2021b). A novel simple and sensitive approach for determination of 1,1-dimethylhydrazine in aqueous samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection after derivatization with unsubstituted aromatic aldehydes. Chemosphere 280, 130747. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130747.

You T., Niu L., Gui J.Y. i in. (1999). Detection of hydrazine, methylhydrazine and isoniazid by capillary electrophoresis with a 4-pyridyl hydroquinone self-assembled microdisk platinum electrode. J. Pharm. Biomed. Anal. 19(1–2), 231–237. DOI: 10.1016/s0731-7085(98)00130-7.

Wróblewska-Jakubowska K. (1997). Metylohydrazyna. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 16, 153–155.

Zhou J., Wang E. (1993). Electrocatalysis and determination of hydrazine compounds in liquid chromatography at a mixed-valent cobalt oxide/cyanocobaltate film electrode. Talanta 40(6), 943–948. DOI: 10.1016/0039-9140(93)80056-W.

Zieliński M., Bonczarowska M., Twardowska E. (2020). Fenylohydrazyna. Metoda oznaczania na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Podst. Met. Oceny Srodow. Pr. 3(105), 143–158. DOI: 10.5604/01.3001.0014.3983.

ZAŁĄCZNIK

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA METYLOHYDRAZYNY NA STANOWISKACH PRACY METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKCJĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania metylohydrazyny (numer CAS: 60-34-4) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych. Najmniejsze stężenie metylohydrazyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,002 mg/m^3.

2. Powołania normatywne

Do stosowania niniejszego dokumentu są niezbędne podane niżej dokumenty, które w całości lub w części zostały w nim normatywnie powołane. W przypadku powołań datowanych ma zastosowanie wyłącznie wydanie cytowane. W przypadku powołań niedatowanych stosuje się ostatnie wydanie dokumentu powołanego (łącznie ze zmianami).

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

3. Terminy i definicje

W niniejszym dokumencie nie wymieniono terminów i definicji.

4. Zasada metody

Metody polega na zatrzymaniu obecnej w badanym powietrzu metylohydrazyny na filtrze z włókna szklanego nasączonego kwasem siarkowym, ekstrakcji zatrzymanego na filtrze związku za pomocą mieszaniny diwodorofosforanu sodu i wersenianu disodu z dodatkiem kwasu fosforowego, przeprowadzeniu wyekstrahowanej metylohydrazyny w pochodną w reakcji z aldehydem benzoesowym i chromatograficznym oznaczeniu powstałego związku.

5. Postanowienia ogólne

5.1. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie ważyć z użyciem wagi analitycznej z działką elementarną co najmniej 0,0002 g.

5.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

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

Pozostałe po analizie odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji uprawnionym instytucjom.

6. Odczynniki i materiały

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

6.1. Metylohydrazyna

Stosować siarczan metylohydrazyny wg rozdziału 6.

6.2. Acetonitryl

Acetonitryl o czystości do HPLC.

6.3. Diwodorofosforan sodu

Stosować diwodorofosforan sodu uwodniony wg rozdziału 6.

6.4. Wersenian disodu

Stosować naważkę analityczną 0,05 mol/l wersenianu disodu (sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego) wg rozdziału 6.

6.5. Kwas fosforowy

Stosować 85-procentowy roztwór kwasu fosforowego(V) wg rozdziału 6.

6.6. Kwas siarkowy

Stosować 96-procentowy kwas siarkowy(VI) wg rozdziału 6.

6.7. Aldehyd benzoesowy

Stosować aldehyd benzoesowy wg rozdziału 6.

6.8. Woda destylowana

Stosować wodę destylowaną o czystości do HPLC.

6.9. Roztwór aldehydu benzoesowego do derywatyzacji

Do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml wg punktu 7.4 zawierającej 45 ml acetonitrylu wg punktu 6.2 odmierzyć 50 µl aldehydu benzoesowego wg punktu 6.7. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi 0,1%.

Roztwór przygotować w dniu analizy.

6.10. Roztwór do ekstrakcji

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 100 ml wg punktu 7.4 odważyć 1,38 g diwodorofosforanu sodu wg punktu 6.3, dodać 90 ml roztworu wersenianu disodu wg punktu 6.4 i 200 µl kwasu fosforowego(V) wg punktu 6.5. Kolbę uzupełnić do kreski roztworem wersenianu disodu.

Roztwór przygotować w dniu analizy.

6.11. Roztwór kwasu siarkowego do pokrywania filtrów

Do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml wg punktu 7.4 zawierającej około 50 ml acetonitrylu odmierzyć 1,69 ml stężonego kwasu siarkowego wg punktu 6.6. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem. Stężenie kwasu siarkowego w roztworze wynosi 0,3 mol/l.

6.12. Roztwór wzorcowy podstawowy metylohydrazyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 1 ml wg punktu 7.4 odważyć dokładnie 3 mg siarczanu metylohydrazyny wg punktu 6.1. Substancję rozpuścić w wodzie wg punktu 6.8 i dokładnie wymieszać. Stężenie czystej metylohydrazyny w tak przygotowanym roztworze wynosi 0,958 mg.

6.13. Roztwór wzorcowy pośredni metylohydrazyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 5 ml wg punktu 7.4 odmierzyć pipetą wg punktu 7.5 taką ilość roztworu wzorcowego podstawowego metylohydrazyny wg punktu 6.12, aby końcowe stężenie metylohydrazyny wynosiło 144 µg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem.

6.14. Roztwory wzorcowe robocze

Do siedmiu kolb pomiarowych o pojemności 1 ml odmierzyć pipetami wg punktu 7.6 następujące objętości roztworu wzorcowego pośredniego metylohydrazyny wg punktu 6.13 w mililitrach: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,75; 1. Kolby uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 6.10. Stężenie metylohydrazyny w tak przygotowanych roztworach wynosi, w mikrogramach na mililitr, odpowiednio: 7,2; 14,4; 28,8; 57,6; 72; 108; 144.

Roztwory wzorcowe przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez 5 dni.

7. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

7.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem spektrofotometrycznym.

7.2. Filtry

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm i średnicy porów 1,6 µm.

7.3. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie metylohydrazyny w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np. kolumna analityczna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową o średnicy ziaren 5 µm, długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm.

7.4. Kolby pomiarowe

Kolby pomiarowe o pojemności: 1 ml, 5 ml, 50 ml i 100 ml.

7.5. Naczynka

Naczynka szklane zamykane o pojemności 2 ml i 4 ml.

7.6. Pipety

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

7.7. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości wg rozdziału 8.

7.8. Mieszadło mechaniczne

7.9. Filtry strzykawkowe

Filtry strzykawkowe z politetrafluoroetylenu.

7.10. Inkubator

7.11. Przygotowanie filtrów do pobierania próbek powietrza

Na filtry wg punktu 7.2 nanieść po 0,2 ml roztworu do pokrywania wg punktu 6.11. Filtry pozostawić do wyschnięcia w eksykatorze. Filtry przygotować bezpośrednio przed wykonaniem badań i przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.

8. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbki powietrza za pomocą

pompy ssącej wg punktu 7.7 przepuścić przez filtr wg punktu 7.2 do 360 l powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 1 l/min.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez 5 dni.

9. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem spektrofotometrycznym

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać oddzielenie metylohydrazyny od innych substancji występujących w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 7.3 optymalne warunki wykonania oznaczania przedstawiono w tabeli.

Dopuszcza się stosowanie innych kolumn chromatograficznych lub innego składu fazy ruchomej zapewniających możliwość selektywnego oznaczenia metylohydrazyny.

10. Sporządzanie krzywej wzorcowania

Na siedem filtrów wg punktu 7.2 za pomocą pipet automatycznych wg punktu 7.6 nanieść po 0,1 ml roztworów wzorcowych roboczych metylohydrazyny wg punktu 6.14. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 7.5. Do każdego naczynka dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 6.10 i przeprowadzić ekstrakcję przez 30 min przy użyciu mieszadła mechanicznego wg punktu 7.8. Zawartość metylohydrazyny w 1 ml tak uzyskanych roztworów wynosi, w mikrogramach, odpowiednio: 0,36; 0,72; 1,44; 2,88; 3,6; 5,4; 7,2 oraz 0 µg w ślepej próbce. Ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 7.9. Do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 7.5 przenieść po 1 ml ekstraktów, dodać 0,5 ml roztworu do derywatyzacji wg punktu 6.9, naczynka szczelnie zamknąć i dokładnie wymieszać ich zawartość. Próbki inkubować przez 30 min w temperaturze 50°C. Po ostudzeniu wykonać analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 9. Sporządzić wykres krzywej wzorcowania, odkładając na osi odciętych zawartość metylohydrazyny, w mikrogramach w 1 ml otrzymanych roztworów, a na osi rzędnych średnie wartości pola powierzchni piku.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie wykresu krzywej wzorcowania.

11. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 7.5, dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 6.10, przeprowadzić ekstrakcję przez 30 min przy użyciu mieszadła mechanicznego wg punktu 7.8. Ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 7.9. Do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 7.5 przenieść 1 ml ekstraktu, dodać 0,5 ml roztworu do derywatyzacji wg punktu 6.9, naczynka szczelnie zamknąć i dokładnie wymieszać ich zawartość. Próbki inkubować przez 30 min w temperaturze 50°C. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 9.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie metylohydrazyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny wg wzoru:

Tabela. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS

Kolumna analityczna	Supelcosil LC-18 25 cm × 3 mm		
Faza ruchoma		woda A	acetonitryl B
Program – gradient (*v. v*)	0 min	55%	45%
	1 min	55%	45%
	4 min	25%	75%
	7 min	25%	75%
	7,5 min	55%	45%
	11 min	55%	45%
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,5 ml/min		
Temperatura kolumny	30°C		
Objętość próbki	5 µl		
Detektor UV-VIS o długości fali λ	282 nm		

$$X = \frac{C}{V} \cdot 2$$

w którym:

- C – zawartość metylohydrazyny w 1 ml roztworu po ekstrakcji, odczytana z krzywej wzorcowania, w mikrogramach;
- V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w litrach.
- 2 – ilość roztworu zużyta do ekstrakcji.