

Chromatograficzna metoda oznaczania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu środowiska pracy¹

dr inż. ANNA JEŻEWSKA
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS: 96-69-5

Słowa kluczowe: 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol), metoda analityczna, metoda chromatografii cieczowej, powietrze na stanowiskach pracy.

Keywords: 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-3-methylphenol), 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-m-cresol), determination method, workplace air, liquid chromatographic analysis.

Streszczenie

W wyniku badań opracowano metodę oznaczania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z dektorem diodowym.

Metoda polega na adsorpcji 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) na filtrze polipropylenowym, ekstrakcji metanolem i analizie chromatogra-

ficznnej otrzymanego roztworu. Metoda umożliwia oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w zakresie stężeń $1 \div 20$ mg/m³. Granica oznaczalności (LOQ) tej metody wynosi 2,5 µg/m³.

Opracowana metoda oznaczania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu środowiska pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

Summary

A new procedure has been developed for the assay of 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-3-methylphenol) (TBBC) using high-performance liquid chromatography with a diode array detector. This method is based on the adsorption of TBBC a polypropylene filters, extraction with methanol and chromatographic analysis of the obtained solution.

The working range is 1 to 20 mg/m³ for a 100-L air sample. Limit of quantification: 2.5 µg/m³.

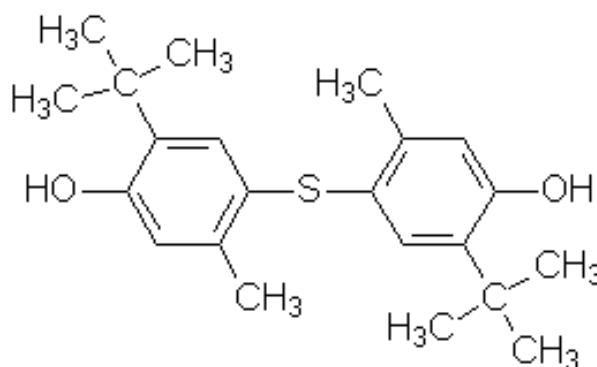
The developed method of determining 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-3-methylphenol) has been recorded as an analytical procedure, which is available in the Appendix.

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2011-2013 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

WPROWADZENIE

4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol), (TBBC) jest białym krystalicznym proszkiem o lekko aromatycznym zapachu (rys. 1.). 4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) jest palny, a jego pyły mogą tworzyć w powietrzu mieszaniny wybu-

chowe; w wodzie jest praktycznie nierozpuszczalny, natomiast rozpuszcza się w: metanolu, acetonie i nieznacznie w benzenie (Toxinet 2012; Gestis 2012; Sigma-Aldrich 2011).



Rys. 1. Wzór strukturalny 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu), (Gestis 2011)

4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) jest otrzymywany w wyniku reakcji 2-*tert*-butylo-5-metylofenolu z dichlorkiem siarki. Jest stosowany jako antyutleniacz przy produkcji gumy i tworzyw sztucznych (Toxinet 2012; Konieczko i in. 2011).

Ze względu na zagrożenia dla zdrowia ludzi 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) został sklasyfikowany w WE (nr 1272/2008) jako substancja o działaniu drażniącym na skórę (kat. 2.) i oczy (kat. 2.), o działaniu toksycznym na narządy docelowe – narażenie jednorazowe (kat. 3.). Według Sigma-Aldrich 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) może być szkodliwy przy wdychaniu, powodując podrażnienie układu oddechowego. Substancja może być także szkodliwa po spożyciu oraz w przypadku absorpcji przez skórę. Powoduje podrażnienie skóry i działa drażniąco na oczy (Sigma-Aldrich 2011).

Wartości normatywów higienicznych w Polsce dla 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) nie zostały jeszcze ustalone. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy (Konieczko i in. 2011) zaproponował wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla związku na

poziomie 10 mg/m³. Wartość NDS dotyczy frakcji wdychalnej.

Do oznaczania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu są stosowane metody wagowe (NIOSH 1994; NIOSH 1998). W przypadku frakcji wdychalnej (pył całkowity) próbki powietrza pobierano na filtr z poli(chlorku winylu), (NIOSH 1994), a w przypadku oznaczania frakcji respirabilnej – na filtr z poli(chlorku winylu) połączony z cyklonem nylonowym (NIOSH 1998).

W streszczeniu niepublikowanej metody OSHA (1993) podano sposób oznaczania frakcji respirabilnej 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu). Powietrze zawierające 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) pobierano na filtr z włókna szklanego połączony z cyklonem nylonowym. 4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV).

Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu środowiska pracy w zakresie stężeń 1 ÷ 20 mg/m³, czyli od 1/10 do 2 wartości NDS zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482:2012.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura

W badaniach stosowano:

- chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) seria 1200 z detektorem diodowym (DAD) sprzężonym on-line; automatyczny podajnik próbek G2258-90010 (Agilent Technologies); oprogramowanie ChemStation do sterowania procesem oznaczania i zbierania danych
- kolumnę Ultra C18 o wymiarach (250 x 4,6 mm) o $dp = 5 \mu\text{m}$, z przedkolumną o wymiarach: 10 x 4,0 mm (Restek, Bellefonte, PA, USA)
- aspiratory Gilair 5 (Sensidyne, Clearwater, FL, USA), zakres pracy: 750 ÷ 5000 ml/min (45 ÷ 300 l/h) do pobierania próbek powietrza
- wytrząsarke mechaniczną WL-2000, (JWElectronic, Warszawa, Polska) do ekstrakcji analitów z filtrów
- wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, Edgewood, NY, USA) do odważania wzorców.

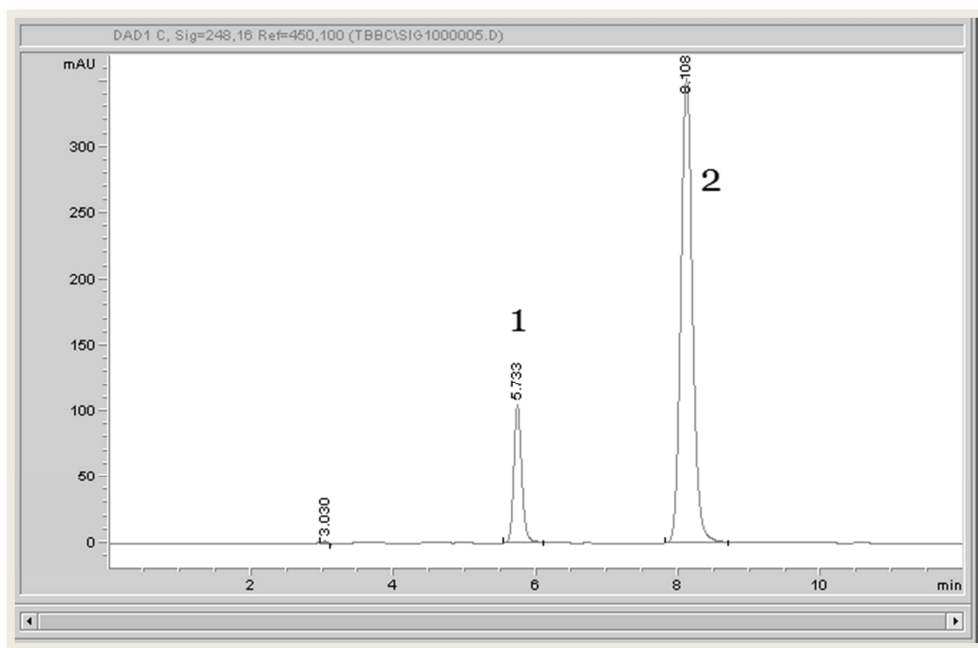
Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: kwas fosforowy(V) firmy Riedel-de Haën (Seelze, Niemcy), 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) i 2-*tert*-butylo-4-metylofenol firmy Merck (Darmstadt, Niemcy), metanol (J. T. Baker, Deventer, Holandia), wodę wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Do badań stosowano odczynniki o czystości do HPLC. Ponadto wykorzystano: filtry z włókna szklanego GF/A o średnicy 37 mm (Whatman, Maidstone, Anglia), filtry polipropylenowe FIPRO 37 o średnicy 37 mm (Instytut Włókiennictwa, Łódź, Polska), bibułę filtracyjną jakościową o średniej szybkości sączenia, (POCH, Gliwice, Polska) do pobierania próbek powietrza, filtry strzykawkowe nylonowe o średnicy 25 mm i wielkości porów 0,45 μm (Alltech, Lexington, KY, USA) do filtrowania roztworów przed analizą, a także szkło laboratoryjne i strzykawki do cieczy.

Ustalenie warunków oznaczania

W wyniku przeprowadzonych badań wstępnych ustalono warunki oznaczania chromatograficznego dla 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w obecności 2-*tert*-butylo-4-metylofenolu (rys. 2). Roztwory 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w metanolu można oznaczać z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem diodowym (DAD) w odwróconym układzie faz. Podczas badań wykorzystywano kolumnę do HPLC typu Ultra C18 z przedkolumną, w temperaturze 20 °C. Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej – 1 ml/min. Jako fazę ruchomą stosowano: metanol, kwas fosforowy(V) roztwór 0,1-procentowy (90: 10, v/v). Objętość analizowanej próbki wynosiła 10 μl . Do detekcji stosowano detektor DAD o długości fali analitycznej $\lambda = 248 \text{ nm}$.



Rys. 2. Chromatogram roztworu wzorcowego 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w obecności 2-*tert*-butylo-4-metylofenolu. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 20 °C, detektor DAD, 1 – 2-*tert*-butylo-4-metylofenol, 2 – TBBC

Badanie osadzania się 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) na filtrach

Wstępne badania osadzania się cząstek 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) przeprowadzono dla trzech rodzajów filtrów: z włókna szklanego, polipropylenowego i z bibuły o średnicy 37 mm. W tym celu złożono układ składający się z dwóch filtrów tego samego rodzaju połączonych szeregowo. Na pierwsze filtry naniesiono 50 µl roztworu do pochłaniania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w metanolu o stężeniu 100 mg/ml (co odpowiada wartości 5 NDS), a po wyschnięciu filtrów, za pomocą aspiratorów przepuszczono 100 litrów powietrza ze strumieniem objętości 100 l/h. Następnie wymywano 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) z filtrów metanolem przez wytrząsanie (za pomocą wytrząsarki mechanicznej). Uzyskany roztwór oznaczano chromatograficznie w warunkach omówionych wcześniej. Roztwory kontrolne uzyskane po wymyciu 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) z drugiego filtra nie zawierały badanej substancji ($R = 0$). Współczynniki odzysku dla poszczególnych filtrów wynoszą:

- filtr polipropylenowy 1,01 (współczynnik zmienności 0,14 %)

- filtr z włókna szklanego 1,02 (współczynnik zmienności 0,16%)
- bibuła filtracyjna 0,98 (współczynnik zmienności 3,31%).

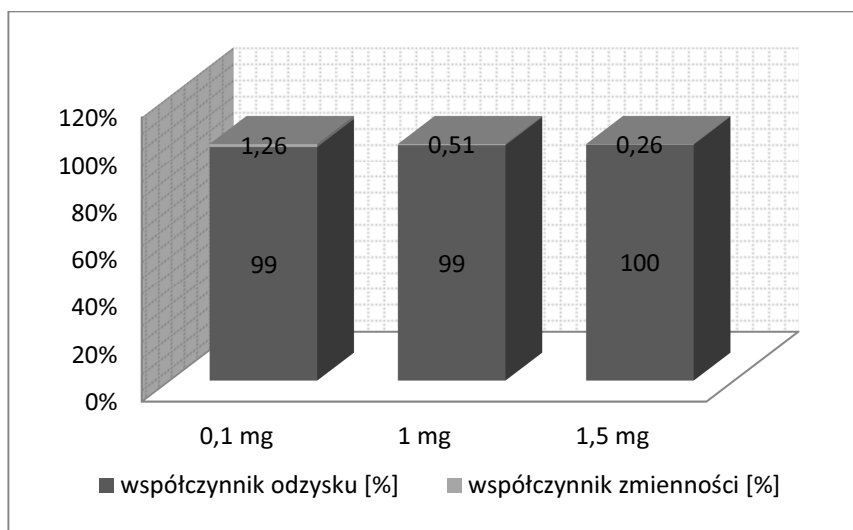
Uzyskane wyniki wskazują na to, że wszystkie badane filtry są odpowiednie do zatrzymywania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu). Do dalszych badań wybrano jednak filtr polipropylenowy, ponieważ wyniki otrzymane z zastosowaniem tego filtra charakteryzują się najmniejszym odchyleniem standardowym (współczynnik zmienności wyniósł 0,14%).

Badania stopnia odzysku

Do badania stopnia odzysku 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) stosowano filtry polipropylenowe. W tym celu na sześć filtrów naniesiono po: 10; 100 i 150 µl roztworu do badania wydajności odzysku 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w metanolu o stężeniu 10 mg/ml. Filtry pozostawiono do wysuszenia. Następnie przeprowadzono odzysk 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) – 5 ml metanolu i po wytrząsaniu roztwory znad filtra oznaczano chromatograficznie. Po odczytaniu powierzchni pików z chro-

matogramów badanych roztworów (wg oprogramowania ChemStation) obliczono współczynniki odzysku. Średni współczynnik odzysku dla trzech

poziomów stężeń wynosi $R = 0,99 \pm 0,7\%$. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 3.



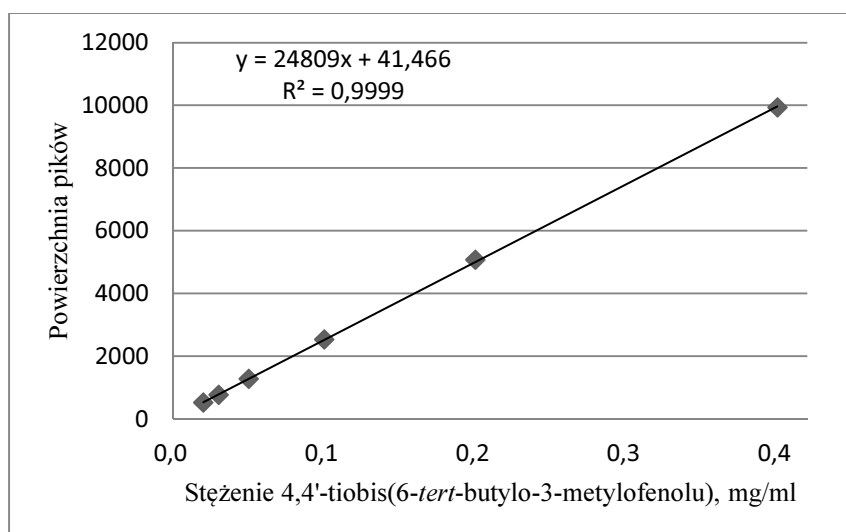
Rys. 3. Współczynniki odzysku 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) uzyskane z filtrów polipropylenowych po naniesieniu: 0,1; 1 i 1,5 mg substancji i przepuszczeniu 100 l powietrza oraz uzyskane odchylenie standardowe ($n = 6$) wyrażone w procentach (współczynnik zmienności)

Kalibracja

W celu przeprowadzenia kalibracji przygotowano trzy serie roztworów wzorcowych 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w metanolu. Zakres roztworów wzorcowych wynosił: $0,02 \div 0,4$ mg/ml. Do chromatografu wprowadzono po 10 μ l roztworów wzorcowych o wzrastających stężeniach. Dla każdego stężenia wykonano po dwa oznaczenia. Następnie odczytano powierzchnie pików według wskazań oprogramowania ChemStation i

sporządzono wykres zależności powierzchni pików 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) od stężenia roztworów kalibracyjnych.

Współczynnik nachylenia „*b*” krzywej kalibracji (rys. 4) o równaniu $y = bx + a$, charakteryzujący czułość metody wynosi 24809. Liniowość krzywej wzorcowej jest charakteryzowana wartością współczynnika korelacji (R^2), który wynosi 0,9999.



Rys. 4. Wykres zależności powierzchni od stężenia 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w roztworach kalibracyjnych. Kolumna Ultra C18, temperatura kolumny 20 °C, detektor DAD

Precyzja

W celu oceny precyzji oznaczeń kalibracyjnych przygotowano roztwór wzorcowy podstawowy 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) w metanolu o stężeniu 2,04 mg/ml. Z tego roztworu wykonano trzy serie po osiem roztworów roboczych przez odmierzenie do kolb miarowych o pojemności 10 ml po: 0,1 ml (I seria), 1 ml (II seria), 1,5 ml (III seria) roztworu wzorcowego podstawowego i dopełnienie metanolem do kreski; 1 ml roztworu zawierał odpowiednio: 0,0204; 0,204 i 0,306 mg 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu). Po wykonaniu analizy chromatograficznej, dla każdej serii obliczono odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Współczynniki zmienności dla kolejnych poziomów stężeń wyniosły odpowiednio: 1,03; 2,37 i 0,66%.

Badanie trwałości pobranych próbek powietrza

Trwałość pobranych próbek powietrza w zależności od czasu ich przechowywania badano w następujący sposób: na sześć filtrów polipropylenowych naniesiono po 100 µl roztworu 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w metanolu o stężeniu 10 mg/ml, co odpowiadało 1 mg 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu). Dwa filtry badano (odzysk – 5 ml metanolu) tego samego dnia, a pozostałe umieszczono w ekssykatorze (temperatura około 20 °C) i analizowano po sześciu i dwunastu dniach. Wyniki badań (przy wykorzystaniu kolumny Ultra C18, temperatura kolumny 20 °C i detektora DAD) przedstawiono w tabeli 1. Z badań wynika, że filtry z 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolem) mogą być przechowywane w laboratorium do dwunastu dni.

Tabela 1.

Wyniki badania trwałości próbek powietrza (filtrów) zawierających 1 mg 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) przechowywanych w ekssykatorze

Numer filtra	Czas przechowywania, liczba dni	Średnie pola powierzchni pików	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności, %
1	0	5019,40	5007,10	17,4	0,3
2		4994,80			
1	6	5039,10	5032,35	9,5	0,2
2		5025,60			
1	12	5021,50	5033,95	17,6	0,3
2		5046,40			

Walidacja

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zamieszczonymi w normie europejskiej PN-EN 482:2012. Wyznaczono takie parametry walidacyjne, jak: granice wykrywalności i oznaczalności, współczynniki odzysku 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) z filtrów na trzech poziomach stężeń, całkowitą precyzję oraz względną niepewność całkowitą metody. Uzyskane dane walidacyjne przedstawiono w tabeli 2.

ści i oznaczalności, współczynniki odzysku 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) z filtrów na trzech poziomach stężeń, całkowitą precyzję oraz względną niepewność całkowitą metody. Uzyskane dane walidacyjne przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Dane walidacyjne metody

Zakres pomiarowy: 0,02 ÷ 0,4 mg/ml (1 ÷ 20 mg/m ³) dla próbki powietrza 100 l	
Granica wykrywalności (LOD)	16,7 ng/ml (0,74 µg/m ³)
Granica oznaczalności (LOQ)	50,2 ng/ml (2,5 µg/m ³)
Całkowita precyzja badania	5,23%
Względna niepewność całkowita	11,45%

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku badań opracowano metodę oznaczania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Zastosowane filtry poli-propylenowe o średnicy 37 mm połączone szeregowo zapewniają ilościowe wyodrębnienie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) z badanego powietrza. Pobrane próbki przechowywane w laboratorium, w temperaturze $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ są trwałe do dwunastu dni. Zastosowana kolumna oktadecylowa Ultra C18 o wymiarach 250 mm x 4,6 mm umożliwia oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-

-butylo-3-metylofenolu) w obecności 2-*tert*-butylo-4-metylofenolu. Metoda umożliwia oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w zakresie stężeń $1 \div 20 \text{ mg/m}^3$ dla próbki powietrza 100 l. Granica oznaczalności (LOQ) tej metody wynosi $2,5 \text{ }\mu\text{g/m}^3$.

Opracowana metoda umożliwia oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu środowiska pracy na poziomie 1/10 wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia i może być wykorzystana do oceny narażenia zawodowego.

PIŚMIENNICTWO

Gestis (2012) Substance Database. 6,6'-Di-*tert*-butyl-4,4'-thiodi-*m*-cresol [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=gestiseng:sdbeng].

Konieczko K., Czerczak S. (2011) 4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol). Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. PiMOŚP 2012, nr 4(74).

NIOSH (1994) Method 0500. Particulates not otherwise regulated, total. NIOSH Manual of analytical methods (NMAM), Fourth Edition, dostęp: 2012-01-13 [http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/0500.pdf].

NIOSH (1998) Method 0600. Particulates not otherwise regulated, respirable. NIOSH Manual of analytical methods (NMAM), Fourth Edition, dostęp: 2012-01-13 [http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/0600.pdf].

OSHA (1993) 4,4'-Thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) (Respirable Fraction). OSHA IMIS Code Number: T165, dostęp: 2012-01-13 [http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_271595.html].

PN-EN 482:2012 Powietrze na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.

Sigma-Aldrich (2011) 5-*tert*-Butyl-4-hydroxy-2-methylphenyl sulfide. Karta Charakterystyki zgodnie z rozporządzeniem WE 1907/2006. Wersja 4.0 z dnia 3.01.2011, dostęp: 2011-12-13 [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do].

Toxinet (2012) Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Santonox, dostęp: 2012-01-11 [http://toxnet.nlm.nih.gov/].

WE 1272/2008 Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 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 (zwanego rozporządzeniem GHS), (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r. (L 353).

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA 4,4'-TIOBIS(6-*tert*-BUTYLO-3-METYLOFENOLU) W POWIETRZU ŚRODOWISKA PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu), jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczenia opisanych w procedurze, wynosi 1 mg/m³.

2. Zasada metody

Metoda polega na przepuszczeniu badanego powietrza zawierającego 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol) przez filtr polipropylenowy, następnie ekstrakcji metanolem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

3. Odczynniki, roztwory i materiały

Do analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki o stopniu czystości, co najmniej cz.d.a. oraz wodę destylowaną o czystości do HPLC, zwaną w dalszej części procedury wodą.

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,000 2 g.

Czynności związane z rozpuszczalnikami organicznymi 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 utylizacją.

- 3.1. Metanol
- 3.2. Kwas fosforowy(V), roztwór 0,1-procentowy (v/v)
- 3.3. 4,4'-Tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenol)
- 3.4. Roztwór wzorcowy podstawowy 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu)

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 10 ml należy odważyć 20 mg 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) wg punktu 3.3., kolbę zważyć, uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 3.1. i dokładnie wymieszać. Stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w tak przygotowanym roztworze wynosi 2 mg/ml. Obliczyć dokładną zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

Roztwór przechowywany w chłodziarce jest trwały przez co najmniej sześć dni.

3.5. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 0,1; 0,15; 0,25; 0,5; 1 i 2 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 3.4., następnie uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 3.1. i wymieszać. Zawartość 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w 1 ml tak przygotowanych roztworów wynosi odpowiednio: 20; 30; 50; 100; 200 i 400 µg.

Roztwory przechowywane w chłodziarce są trwałe przez co najmniej sześć dni.

3.6. Roztwór do wyznaczania współczynnika odzysku

Do zważonej kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć około 100 mg 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) wg punktu 3.3., zważyć, uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 3.1. i dokładnie wymieszać. Obliczyć dokładną zawartość 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu). Stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w tak przygotowanym roztworze wynosi 10 mg/ml.

3.7. Filtry

Stosować filtry polipropylenowe o średnicy 37 mm.

4. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny.

4.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem diodowym i elektronicznym integratorem.

4.2. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu), np. kolumna o długości 25 cm, średnicy

wewnętrznej 4,6 mm, wypełniona fazą oktadecylową o uziarnieniu 5 µm z przedkolumną.

4.3. Strzykawki do cieczy

Strzykawki do cieczy o pojemności 10 ÷ 5 ml.

4.4. Kolby stożkowe

Wyposażone w korki kolby stożkowe o pojemności 25 ml.

4.5. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 5.

5. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez dwa filtry wg punktu 3.7., połączone szeregowo i umieszczone w oprawkach, należy przepuścić do 100 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości, nie większym niż 100 l/h.

Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość co najmniej dwanaście dni.

6. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby uzyskać rozdział 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 4.2., oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

- temperatura kolumny 20 °C
- faza ruchoma: metanol:
kwas fosforowy(V) wg
punktu 3.2. 90: 10
- natężenie przepływu
strumienia fazy
ruchomej 1 ml/min
- długość fali analitycznej
detektora diodowego 248 nm
- objętość próbki 10 µl.

7. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 10 µl roztworów wzorcowych roboczych 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) wg punktu 3.5. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików

według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w mikrogramach na mililitr, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

8. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza filtry (każdy osobno) przenieść do kolb wg punktu 4.4. Następnie dodać 5 ml metanolu wg punktu 3.1., kolbę zamknąć i wytrząsać na wytrząsarce przez 30 min. Po tym czasie roztwór znad filtra badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 6. Wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w próbce odczytać z wykresu krzywej wzorcowej.

W taki sam sposób wykonać oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w roztworze z drugiego filtra. Masa 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) oznaczona w roztworze znad drugiego filtra nie powinna przekraczać 10% masy oznaczonej w roztworze znad pierwszego filtra, w przeciwnym razie wynik należy traktować jako orientacyjny.

9. Wyznaczanie współczynnika odzysku

W pięciu kolbach wg punktu 4.4. umieścić czyste filtry wg punktu 3.7. Na każdy filtr nanieść po 100 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku wg punktu 3.6. i pozostawić filtry do wyschnięcia. W szóstej kolbie przygotować próbkę kontrolną zawierającą tylko filtr. Następnie dodać po 5 ml metanolu wg punktu 3.1. Kolby zamknąć i wytrząsać na wytrząsarce przez 30 min. Po tym czasie roztwór znad filtra badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 6. Wykonać dwukrotny pomiar.

Jednocześnie wykonać oznaczanie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu), co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie strzykawką wg punktu 4.3. po 100 μ l roztworu do wyznaczania współczynnika odzysku wg punktu 3.6. do kolby miarowej o pojemności 5 ml i uzupełnić metanolem wg punktu 3.1. do kreski. Tak uzyskane roztwory badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 6.

Współczynnik odzysku dla 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) (d) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

P_d – średnia powierzchnia pików 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) na chromatogramach roztworów po odzysku,

P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) na chromatogramach roztworu kontrolnego,

P_p – średnia powierzchnia pików 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku (\bar{d}) dla 4,4'-tiobis(6-*tert*-bu-

tylo-3-metylofenolu) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Współczynnik odzysku należy wyznaczać dla każdej nowej partii filtrów.

10. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{5 \cdot (c_1 + c_2)}{V \cdot d}$$

w którym:

c_1 – stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w roztworze znad pierwszego filtra odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,

c_2 – stężenie 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) w roztworze znad drugiego filtra odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,

V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w litrach,

d – średnia wartość współczynnika odzysku wyznaczana zgodnie z punktem 9.,

5 – objętość metanolu użytego do wymywania 4,4'-tiobis(6-*tert*-butylo-3-metylofenolu) z filtrów, w mililitrach.