

# Cisplatyna

## Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy<sup>1</sup>

### Cisplatin

#### Determination in workplace air with high performance liquid chromatography

*dr MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA*

*e-mail: mapol@ciop.pl*

*dr MAŁGORZATA POŚNIAK*

*e-mail: mapos@ciop.pl*

*dr inż. SYLWIA KRZEMIŃSKA*

*e-mail: sykrz@ciop.lodz.pl*

*Centralny Instytut Ochrony Pracy –*

*Państwowy Instytut Badawczy*

*00-701 Warszawa*

*ul. Czerniakowska 16*

Numer CAS 15663-27-1

**Słowa kluczowe:** cisplatyna, leki cytostatyczne, metoda analityczna, wysokosprawna chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy.

**Keywords:** cisplatin, cytostatic drugs, analytical method, high performance liquid chromatography, workplace air.

#### Streszczenie

Leki cytostatyczne są specyficzną grupą leków stosowanych w chemioterapii, których szkodliwe działanie na pacjentów poddawanych leczeniu jest stosunkowo dobrze poznane. Brak jest jednak danych o szkodliwych skutkach oddziaływania

tych substancji chemicznych na osoby narażone podczas przygotowywania i stosowania cytostatyków. Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie frakcji wdychalnej aerozolu cisplatyny (CP) w powietrzu środowi-

<sup>1</sup> Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach III etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2014-2016 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej (Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej).  
Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

ska pracy na poziomie  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , tj. około 1/10 proponowanej przez American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), która wynosi  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Metoda polega na wyodrębnieniu frakcji wdychalnej aerozolu cisplatyny (CP) z powietrza na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji analitu wodą destylowaną, a następnie, po przeprowadzeniu w pochodną z dietylotiokarbaminianem sodu (NaDDTC), analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu. Do oznaczania zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Analizy prowadzono w układzie faz odwróconych (faza ruchoma - metanol: woda) z zastosowaniem kolumny analitycznej wypełnionej modyfikowanym żelem krzemionkowym (C18).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono zakres pomiarowy metody  $0,03 \div$

$10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , co dało  $0,18 \div 62,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  przy pobieraniu 960 l oraz  $0,25 \div 83,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  przy pobieraniu 720 l powietrza. W tym zakresie pomiarowym uzyskana krzywa kalibracji miała przebieg liniowy, o czym świadczy współczynnik regresji na poziomie 0,996. Całkowita precyzja badania wynosiła 6,25%, a niepewność rozszerzona metody była na poziomie 27,71.

Uzyskane wyniki i parametry walidacyjne potwierdzają przydatność nowo opracowanej metody oznaczania cisplatyny do oznaczania stężeń tej substancji chemicznej w powietrzu na stanowiskach pracy w celu oceny narażenia zawodowego w szerokim zakresie stężeń  $0,03 \div 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Opracowana metoda oznaczania została zapisana w postaci procedury analitycznej (zamieszczonej w załączniku) w zakresie pomiarowym  $0,03 \div 0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , co odpowiada  $0,1 \div 1,6$  wartości NDS przy pobieraniu 960 l powietrza oraz  $0,125 \div 2$  wartości NDS przy pobieraniu 720 l powietrza.

## Summary

Cytostatic drugs are a specific group of chemotherapy drugs whose toxicity for patients undergoing treatment is reasonably well understood. However, there is no data on the harmful effects of the impacts of these chemicals on exposed persons during preparation and application of anticancer drugs.

The aim of this study was to develop a method for determining an inhalable aerosol fraction of cisplatin in workplace air at the level of  $0.2 \text{ mg}/\text{m}^3$ , which is 1/10 of allowable concentration level of  $2 \text{ ug}/\text{m}^3$  proposed by the ACGIH.

This method is based on sampling of inhalable fraction of cisplatin from the air on the filter glass fiber. After extracting with distilled water, derivative with sodium diethyldithiocarbamate (NaDDTC) was analyzed with high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. Analysis was performed on reverse phase (mobile phase - methanol: water) using an analytical column with modified silica gel column (18).

On the basis of performed studies, measuring range of  $0.03\text{--}10 \text{ mg}/\text{ml}$  was determined which gave  $0.18\text{--}62.5 \text{ ug}/\text{m}^3$  when downloading 960 L of air and  $0.25\text{--}83.3 \text{ ug}/\text{m}^3$  when downloading 720 L of air. The resulting calibration curve was linear as demonstrated by the regression coefficient of 0.996. The overall precision of the study was 6.25% and expanded uncertainty of the method was 27.71.

The results and validation parameters confirm the usefulness of newly developed method for determining cisplatin to determine concentrations of this substance in workplace air to evaluate occupational exposure in a wide concentration range of  $0.03\text{--}10 \text{ ug}/\text{ml}$ . The developed method of determining cisplatin in workplace air has been recorded as an analytical procedure for measuring range of  $0.03\text{--}0.5 \text{ mg}/\text{ml}$  which corresponds to 0.1–1.6 NDS value when downloading the 960 L of air and from 0.125–2 when downloading 720 L of air.

## WPROWADZENIE

Rosnąca liczba zachorowań na choroby nowotworowe powoduje systematyczne zwiększanie zużycia leków cytostatycznych. Przyczynia się to do wzrostu liczby narażonych pracowników służby zdrowia i przemysłu farmaceutycznego

na substancje chemiczne, stwarzające poważne zagrożenie dla zdrowia. Leki cytostatyczne są specyficzną grupą leków stosowanych w chemioterapii, których szkodliwe działanie na pacjentów poddawanych leczeniu jest stosunkowo

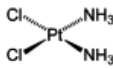
dobrze poznane. Nie ma jednak wystarczających naukowo potwierdzonych danych o szkodliwych skutkach oddziaływania tych substancji chemicznych na osoby narażone podczas wykonywania czynności zawodowych. Zawodowymi grupami narażonymi na działanie cytostatyków są przede wszystkim: pielęgniarki, lekarze zatrudnieni na oddziałach onkologicznych oraz farmaceuci aptek przychodniowych sporządzających leki cytostatyczne do wlewów i iniekcji. Również pracownicy laboratoriów medycznych, technicy medycy, a także członkowie ekip sprzątających mogą mieć kontakt z tymi szkodliwymi substancjami chemicznymi.

Cisplatyna jest jednym z najpowszechniej stosowanych leków w chemioterapii chorób nowotworowych z grupy leków alkilujących – najstarszej grupy leków cytotoksycznych. Jest w terapii stosowana przeważnie w połączeniu

z innymi cytostatykami. Stosuje się ją m.in. w leczeniu: nowotworów układu krwiotwórczego – ziarnicy złośliwej, przewlekłej białaczki limfatycznej, chłoniaków złośliwych oraz raka: płuc, sutka, jąder, jajników, prostaty i czerniaka złośliwego, jak również szeregu guzów litych, w tym mięsaków i nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Wspólnym działaniem niepożądanym wszystkich cytostatyków alkilujących są uszkodzenia: wątroby, szpiku kostnego (leukopenia, trombocytopenia, niedokrwistość) i błon śluzowych przewodu pokarmowego, narządów rozrodczych, a także obniżenie odporności komórkowej humoralnej. Podstawowe właściwości fizykochemiczne cisplatyny podano w tabeli 1., natomiast właściwości toksyczne i farmakologiczne – w tabeli 2.

**Tabela 1.**  
**Właściwości fizykochemiczne cisplatyny (CP)**

Cisplatyna (CP)	
Synonimy	<i>cis</i> -diaminadichloroplatyna(II), cisplatinum, <i>cisplatin</i> , diamminedichloroplatinum
Informacje ogólne	
Numer CAS	15663-27-1
Wzór sumaryczny	H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> Pt
Wzór strukturalny	
Masa molowa	300,05 g/mol
Właściwości fizykochemiczne	
Wygląd	żółty, bezwonny proszek
Gęstość i stan skupienia	3,7 ÷ 3,738 g/cm <sup>3</sup> ; ciało stałe
Rozpuszczalność	w wodzie: 2,53 g/l dimetyloformamid: dość trudno rozpuszczalna etanol: praktycznie nierozpuszczalna
Temperatura topnienia	270 °C (rozkład)
logP	-2,19
Temperatura zapłonu	nie dotyczy
Dawka śmiertelna	LD <sub>50</sub> 6,4 mg/kg (szczur, dootrzewnowo)

**Tabela 2.**  
**Podstawowe właściwości toksyczne i farmakologiczne cisplatyny (CP)**

Klasyfikacji i oznakowania Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008	
	
Niebezpieczeństwo. Piktogramy określone w rozporządzeniu mają czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem, na tyle szerokim, aby było wyraźnie widoczne	
Zwroty H	H300 – połknięcie grozi śmiercią H318 – powoduje poważne uszkodzenie oczu H350 – może powodować raka (podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inna droga narażenia nie powoduje zagrożenia)
Zwroty EUH	brak zwrotów EUH
Zwroty P	P201 – przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności P264 – przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności P280 – stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy P301+P310 – w razie połknięcia natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem P305+P351+P338 – w razie dostania się do oczu ostrożnie płukać wodą przez kilka minut; wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć P308+P313 – w razie narażenia lub styczności zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
Farmakokinetyka	
Działanie	cytostatyczne
Okres półtrwania	20 ÷ 30 min
Wiązanie z białkami osocza i tkanek	> 90%
Wydalenie	z moczem

Wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) cisplatyny nie jest w Polsce ustalona. Natomiast podawane w kartach charakterystyk tego związku dane o dopuszczalnych limitach narażenia zawodowego wskazują, że wartości te są w USA zaproponowane na poziomie  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , a w Holandii –  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Cisplatyna jest jedną z 79 substancji rakotwórczych, którą umieszczono na priorytetowej liście niebezpiecznych dla zdrowia człowieka substancji, dla których powinny być jak najszybciej ustalone prawnie obowiązujące wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego (CAREX 2014).

Metody oznaczania cisplatyny opisane w piśmiennictwie dotyczą głównie oznaczania tego związku w materiale biologicznym (we

krwi oraz w plazmie i tkankach) i są dedykowane do prowadzenia badań w celu zredukowania negatywnego wpływu tego cytostatyku na zdrowe tkanki w trakcie prowadzenia chemoterapii u chorych na nowotwory, a także do badań farmakokinetyki leku (*Basotra* i in. 2013; *Bosch* i in. 2008; *Anupama* i in. 2007). Zastosowanie metody adsorpcyjnej spektrometrii atomowej umożliwia oznaczanie tego związku na poziomie  $0,3 \div 0,6 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Ze względu na uzyskiwanie lepszej oznaczalności, częściej jest wykorzystywana technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV). Z uwagi na słabą absorpcję cisplatyny w rejonie UV, związek ten jest przeprowadzany w pochodne, np. z: dietyloditiokarbaminianem, wodorosiarczkiem sodu,

*o*-fenylenodiaminą (Bosch i in. 2008; Tezcan i in. 2013). Granica wykrywalności tych metod wynosi  $10 \div 30$  ng/ml.

Do oznaczania cisplatyny jest również wykorzystywana chromatografia cieczowa z podwójnym detektorem spektrometrii mas (LC/MS/MS), co pozwala na analizę adduktów cisplatyny z jonami:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_3^+$  oraz produktów hydrolizy  $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$  i  $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^+$ , a także pochodnych powstających w reakcji z dietylotiokarbaminianem lub glutationem. Granica wykrywalności tych metod jest na poziomie  $5 \div 10$  ng/ml. Najczęściej stosowanym odczynnikiem derywatyżującym jest sól sodowa dietylotiokarbaminianu (NaDDTC) – 4-procentowy roztwór w 0,01 (mol)l wodorotlenku sodu. Reakcję prowadzi się w podwyższonej temperaturze  $37 \div 45$  °C przez kilkadziesiąt minut.

Metoda stosowana przez badaczy amerykańskich z National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) do oceny narażenia na ten cytostatyk personelu medycznego wykorzystuje technikę ICP/MS do ilościowego oznaczania związku w próbkach powietrza i wymazach pobranych z różnych powierzchni pomieszczeń szpitalnych (Couch, Burr 2010). Gdy jest pobierane 960 l powietrza, najmniejsze oznaczane stężenie cisplatyny wynosi  $0,18 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie frakcji wdychalnej aerozolu cisplatyny w powietrzu środowiska pracy na poziomie  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , tj. około 1/10 proponowanej przez ACGIH wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), która wynosi  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $0,002 \text{ mg}/\text{m}^3$ ).

## Metoda badań

Ze względu na możliwości aparaturowe, do oznaczania cisplatyny w powietrzu na stanowiskach pracy zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS), podczas badań nad: ustaleniem parametrów wyodrębniania sub-

stancji z powietrza, przygotowaniem pobranej próbki powietrza do analizy i ilościowym oznaczaniu badanej substancji. Stosowanie tej metody wymagało przeprowadzenia cisplatyny w pochodną w celu uzyskania odpowiedniej oznaczalności metody.

## Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Elite LaChrom Merck – Hitachi i detektor spektrofotometryczny L-2450 z automatycznym podajnikiem próbek L2200 oraz kolumnę analityczną C-18 wypełnioną żelami krzemionkowym modyfikowanym (RP-18 *endcapped phurosphere star*) o wymiarach  $250 \times 4,6$  mm i uziarnieniu  $5 \mu\text{m}$  z przedkolumną (firmy Merck, Niemcy). Do pobierania i przygotowania próbek powietrza do badań stosowano: aspirator Gilian 3500 (SKC Inc., USA), próbnik do wyodrębniania cząstek aerozolu zgodnie z wymaganiami dla frakcji wdychalnej, typ I.O.M. (SKC Inc., USA), wytrząsarke mechaniczną WL-2000, (JWElectronic, Polska), wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA), płaszcz grzejny (Grant, Anglia) oraz eksykator szafkowy serii EKS (WSL, Polska).

## Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: cisplatynę 100 mg wg Farmakopei Europejskiej (European Pharmacopea Referency Standard, Sigma-Aldrich, USA), dietylotiokarbaminian sodu trihydrat (NaDDTC) cz.d.a. (Sigma-Aldrich, USA); kwas octowy, kwas fosforowy, wodorotlenek sodu cz.d.a. (POCHS.A., Polska); acetonitryl, metanol o czystości do HPLC (Merck, Niemcy); wodę wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA); filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm (SKC, USA); szkło laboratoryjne: kolby miarowe, kolby stożkowe 25 ml, pipety, strzykawki.

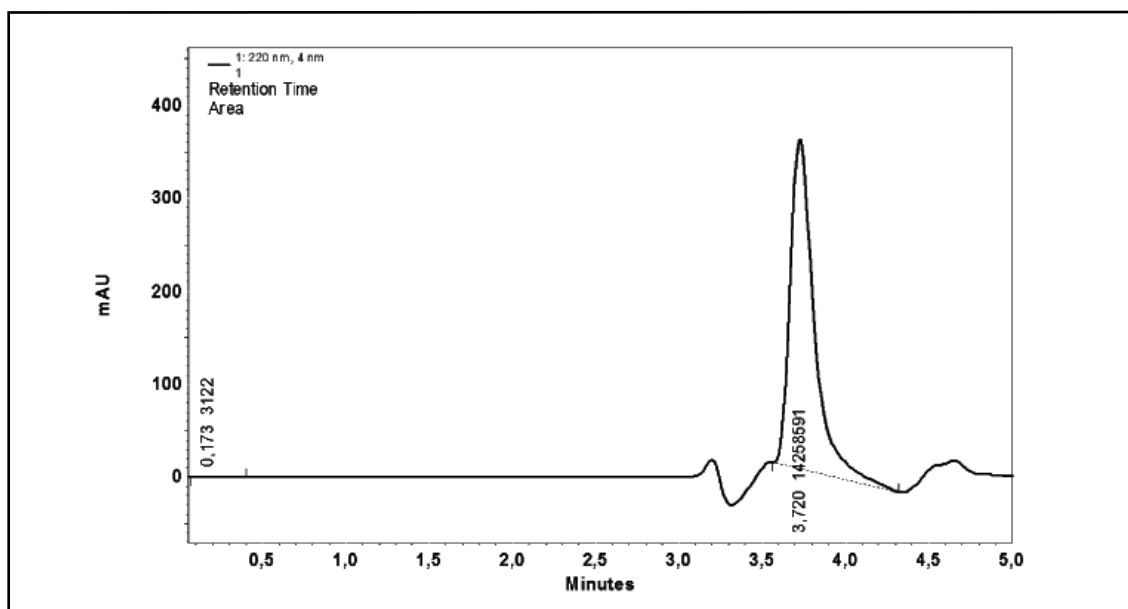
## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

## Ustalenie warunków oznaczania chromatograficznego

Badania prowadzono, stosując wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem spektrofotometrycznym UV-VIS i kolumnę analityczną C-18 wypełnioną modyfikowanym żelem krzemionkowym (RP-18 *endcapend phurosphere star*) w układzie faz odwróconych.

Wstępne próby dotyczące bezpośredniego oznaczania cisplatyny w soli fizjologicznej potwierdziły wyniki badań opisanych w piśmiennictwie (Kaushik i in. 2010). Najmniejsze stężenie cisplatyny (100 µg/ml) oznaczono,

stosując jako fazę ruchomą acetonitryl i bufor amonowy o pH = 4,5 w stosunku objętościowym (45: 55) i strumieniu objętości 0,5 ml/min oraz detektor UV-VIS rejestrujący sygnał przy długości fali  $\lambda = 220$  nm. W tych warunkach uzyskana czułość metody jest jednak mała, a zakłócenia linii zerowej spowodowane solą fizjologiczną w próbce uniemożliwiały prawidłowe odczytanie powierzchni piku, szczególnie na niższych poziomach stężeń (rys. 1.), w związku z tym, do dalszych prób roztwory wzorcowe cisplatyny przygotowywano w wodzie destylowanej.

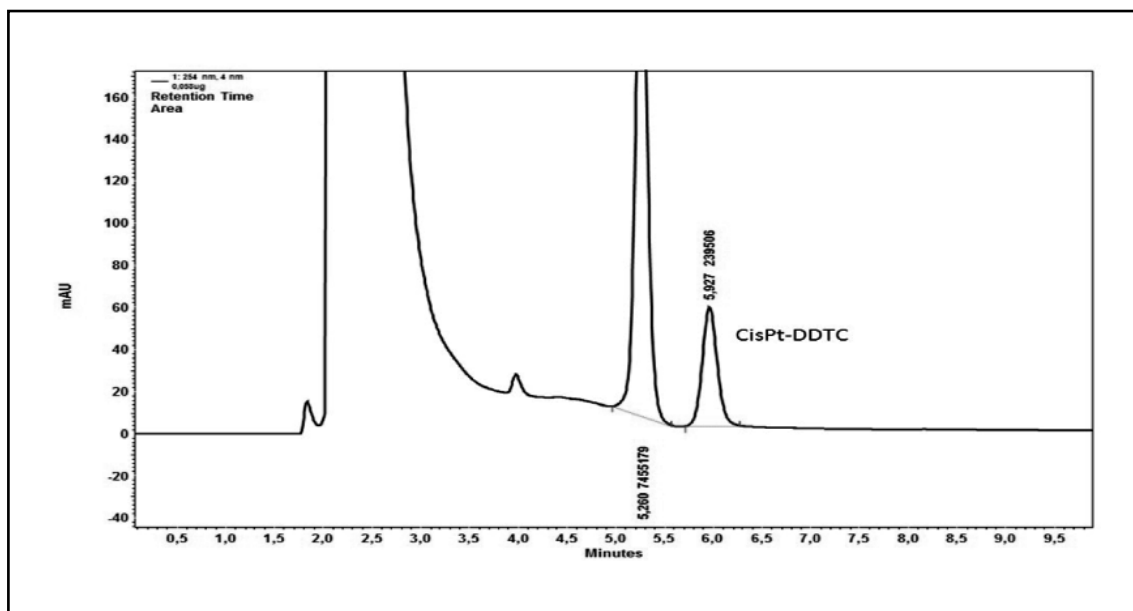


**Rys. 1.** Chromatogram roztworu wzorcowego cisplatyny (CP) o stężeniu 250 µg/ml. Kolumna encapowana C-18, faza ruchoma: ACN: 0,02 (mol)/l bufor amonowy (45: 55)

W celu uzyskania oznaczalności cisplatyny na poziomie nanogramów (ng) badania kontynuowano, wykorzystując reakcję tego związku z solą sodową dietylotiokarbaminianu (NaDDTC), zgodnie z procedurą opisaną w piśmiennictwie (Tezcan i in. 2013). W celu uzyskania pochodnej cisplatyny (CDDTC) do 0,5 ml roztworu wzorcowego cisplatyny w wodzie dodawano 0,5 ml 4-procentowego roztworu soli sodowej dietylotiokarbaminia-

nu (NaDDTC) w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu (NaOH). Następnie kolbę umieszczano w płaszczu grzejnym o temperaturze 37 °C na 45 min. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej roztwór analizowano, stosując kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym (RP-18 *endcapend phurosphere star*) o wymiarach 250 x 4,6 mm i uziarnieniu 5 µm z przedkolumną i detekcją spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda = 254$  nm. Najlepszy

rozdział pochodnej cisplatyny (CisPt-DDTC) jętości fazy wynosił 1 ml/min. W tych warunkach roztwór odczynnika derywatyzującego nie przeszkadzał w oznaczaniu pochodnej cisplatyny (rys. 2.).



Rys. 2. Chromatogram roztworu wzorcowego pochodnej cisplatyny (CP) 60 ng/ml. Kolumna C-18, faza ruchoma: metanol: woda (20: 80 v/v)

### Ustalenie warunków pobierania próbek powietrza

Cisplatyna (CP) jest emitowana do powietrza stanowisk pracy w postaci aerozolu cząstek stałych, w procesie produkcji leku lub aerozolu cieczy, podczas przygotowywania i stosowania wlewów oraz iniekcji stosowanych w chemioterapii. Z tego względu, do oceny narażenia zawodowego w przypadku tej substancji należy oznaczać jej zawartość we frakcji wdychalnej aerozolu, wyodrębnionej z badanego powietrza na odpowiednio dobranych filtrach.

Do badań wybrano filtry z włókna szklanego, powszechnie stosowane podczas pobierania próbek powietrza zawierającego aerozole substancji organicznych. Do wymywania cisplatyny z filtrów zastosowano wodę destylowaną, ponieważ substancja ta jest rozpuszczalna w wodzie.

Przeprowadzono badania stopnia odzysku cisplatyny z filtrów. W pięciu kolbach stożkowych Erlenmayera umieszczono filtry z włókna szklanego i naniesiono po 50 µl roztworu cisplatyny o stężeniu 100,0 µg/ml. Filtry pozostawiono do wyschnięcia. Następnie do kolb dodano po 3 ml wody destylowanej i wytrząsano przez 30 min, stosując wytrząsarkę mechaniczną. Roztwory porównawcze przygotowano w identyczny sposób, ale bez filtrów. Następnie pobrano po 0,5 ml roztworów, przeniesiono do kolb o pojemności 1 ml i dodano 0,5 ml roztworu derywatyzującego, tj. 4-procentowego roztworu soli sodowej dietylotiokarbaminianu (NaDDTC) w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu (NaOH). Po przeprowadzeniu reakcji dokonano oznaczenia cisplatyny w roztworach z nad filtrów i w roztworach porównawczych. Średni współczynnik odzysku wyniósł 0,85 (tab. 3.).

**Tabela 3.****Wyniki badania współczynnika odzysku cisplatyny (CP) z filtrów**

Powierzchnia pików z roztworów po ekstrakcji wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia powierzchnia pików z roztworów po ekstrakcji	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych	Współczynnik desorpcji	Średni współczynnik desorpcji
1	17 784 582 18 896 926	18 340 754	0,917	
3	17 784 582 16 672 238	17 228 410	0,862	
3	16 674 582 16 676 926	16 675 754	0,834	0,858
4	16 679 270 16 791 614	16 735 442	0,837	
5	16 793 958 16 796 302	16 795 130	0,840	
Średnia powierzchnia pików 17 155 098,0				
Odchylenie standardowe, S 755 487,5				
Współczynnik zmienności, n, % 4,40				

Badania wyodrębniania cisplatyny z powietrza przeprowadzano w następujący sposób. Dwa filtry z włókna szklanego umieszczono w oprawce do próbnika I.O.M. Na pierwszy filtr naniesiono 50 µl roztworu cisplatyny o stężeniu 100 µg/ml, a na drugi filtr nie naniesiono badanej substancji i przepuszczano 240 l powietrza ze strumieniem objętości 2 l/min. Kolejne zestawy przygotowano analogicznie i przepuszczono 480 i 960 l powietrza z takim samym strumieniem objętości. Analit wmywano z filtrów 3 ml wody destylowanej.

Następnie pobierano po 0,5 ml roztworu z nad filtrów, przenoszono do kolb o pojemności 1 ml i dodawano 0,5 ml roztworu derywatyzującego NaDDTC. Po przeprowadzeniu reakcji derywatywacji oznaczano pochodną cisplatyny metodą chromatografii cieczowej. Na podstawie wyników badań przedstawionych w tabeli 4. wykazano, że cisplatyna zatrzymuje się na pierwszym filtrze z włókna szklanego. Zawartość cisplatyny na drugim filtrze nie przekraczała 2% zawartości tego związku oznaczonych na filtrze pierwszym.

**Tabela 4.****Przykładowe wyniki pochłaniania i wmywania cisplatyny (CP) z filtrów z włókna szklanego. Kolumna encapowana C-18, faza ruchoma: metanol: woda (20: 80 v/v)**

Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/min	Czas pochłaniania, min	Objętość pobranego powietrza, l	Przybliżone stężenie CP w powietrzu, µg/m <sup>3</sup>	Średnie pole powierzchni pików pochodnej CP w roztworach po wymyciu, wg wskazań integratora	
				I filtr	II filtr
2,0	120	240	20	13 823 049	n.w.
	120	240	20	14 448 155	n.w.
	240	480	10	19 549 794	321 868
	240	480	10	19 347 523	313 395
	240	480	10	18 784 582	319 934
	480	960	5	18 654 683	31 3398
	480	960	5	19 087 654	305 402

Objaśnienia: n.w. – nie wykryto.

Uzyskane wyniki wskazują, że filtr z włókna szklanego zapewnia ilościowe wyodrębnienie cisplatyny z badanego powietrza przy pobieraniu próbki o objętości 960 l.

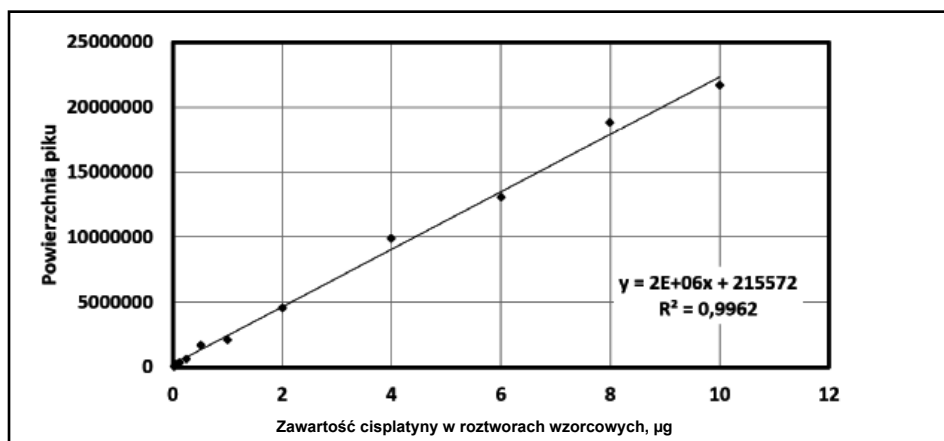


## Kalibracja

Przygotowano trzy serie roztworów kalibracyjnych z dwóch niezależnych roztworów wzorcowych o stężeniu 1 i 20 µg/ml cisplatyny (CP) w wodzie.

Roztwory wzorcowe robocze przygotowano w następujący sposób. Do pięciu kolb miarowych o pojemności 1 ml odmierzono kolejno po: 0,03; 0,06; 0,125 i 0,50 ml roztworu wzorcowego o stężeniu 1 µg/ml. Do kolejnych sześciu kolb miarowych o pojemności 1 ml odmierzono kolejno po: 0,05; 0,1; 0,1; 0,3; 0,4 i 0,5 ml roztworu wzorcowego o stężeniu 20 µg/ml. Następnie do wszystkich kolb dodawano po 0,5 ml 4-procentowego roztworu NaDDTC w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu (NaOH) i uzupełniono wodą do kreski. Roz-

twory termostatowano w płaszczu grzejnym o temperaturze 37 °C przez 45 min. Po tym czasie do chromatografu wprowadzano za pomocą pętli dozowniczej po 80 µl roztworów wzorcowych roboczych. Z każdego roztworu wzorcowego wykonywano dwukrotny pomiar, odczytywano powierzchnie pików i obliczano średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie była większa niż ±5% tej wartości. Następnie wykreślano krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość cisplatyny w 1 ml roztworów wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików pochodnej cisplatyny (CDDTC). Wykres krzywej kalibracji przedstawiono na rysunku 3., a wyniki kalibracji w tabeli 5.



Rys. 3. Wykres zależności powierzchni pików od stężenia pochodnej cisplatyny (CDDTC) w roztworach wzorcowych

Tabela 5.

Wyniki badań kalibracyjnych roztworów wzorcowych roboczych cisplatyny (CP) o stężeniach w zakresie 0,03 ÷ 10 µg/ml

Stężenie, x, µg/ml	Średnia powierzchnia pików, $y_{sr}$ wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III	Odchylenie standardowe, S	Współczynnik zmienności, V, %	Współczynnik kalibracji, B $f(c) = y/x$
	I seria	II seria	III seria				
10	22 144 008	20 198 946	22 625 323	21 656 092	1 284 668	5,93	2 165 609
8	18 762 301	18 610 563	18 894 877	18 755 914	142 265	0,76	2 344 489
6	13 301 128	13 038 712	12 684 719	13 008 186	309 336	2,38	2 168 031
4	9 916 879	9 832 086	9 905 478	9 884 814	46 019	0,47	2 471 204
2	4 663 565	4 649 734	4 638 291	4 650 530	12 656	0,27	2 325 265
1	2 184 296	2 157 457	2 199 370	2 180 374	21 230	0,97	2 180 374
0,5	1 779 624	1 742 067	1 689 165	1 736 952	45 446	2,62	3 473 904

cd. tab. 5.

Stężenie, $x$ , $\mu\text{g/ml}$	Średnia powierzchnia pików, $y_{sr}$ wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III	Odchylenie standardowe, $S$	Współczynnik zmienności, $V$ , %	Współczynnik kalibracji, $B$ $f(c) = y/x$
	I seria	II seria	III seria				
0,25	626 273	617 621	611 478	618 457	7433	1,2	2 473 829
0,125	373 246	383 020	373 246	376 504	5643	1,5	3 012 032
0,06	209 611	216 825	221 224	215 887	5863	2,72	3 482 043
0,03	101 019	110 738	123 268	111 675	11 154	9,99	3 602 419
Współczynnik korelacji, $R$	0,9987	0,9957	0,9983	0,9981			
Średnia wartość współczynnika kalibracji				2 699 927			
Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji, $S_b$				577 160			
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, $n_{kal}$ , %				21			

## Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej (PN-EN 482: 2012).

W celu wyznaczenia precyzji etapu analitycznego z niezależnych roztworów podstawowych przygotowano cztery serie pomiarowe o stężeniach odpowiednio: 0,03; 1,5; 6 i 10  $\mu\text{g/ml}$  po cztery roztwory wzorcowe każda, zgodnie z procedurą opisaną przy sporządzaniu kalibracji. Następnie po 80  $\mu\text{l}$  każdego z roztworów (po derywatywacji) poddano analizie chromatograficznej w takich samych warunkach, jak przy

sporządzaniu krzywej wzorcowej.

Wyznaczone na podstawie wyników przeprowadzonych badań parametry walidacyjne, podane w tabeli 6., potwierdzają przydatność nowo opracowanej metody oznaczania cisplatyny do oznaczania stężeń tej substancji chemicznej w powietrzu na stanowiskach pracy w celu oceny narażenia zawodowego.

Na podstawie odczytanych powierzchni pików obliczono odchylenie standardowe ( $S$ ) i współczynnik zmienności dla danego poziomu stężeń ( $v$ ). Średnia precyzja oznaczania wyniosła 3,75. Wyniki badania precyzji oznaczania cisplatyny zestawiono w tabeli 7.

Tabela 6.

### Dane walidacyjne metody oznaczania cisplatyny (CP) w powietrzu

Walidowane parametry	Wartości
Zakres pomiarowy:	0,03 ÷ 10 $\mu\text{g/ml}$
– przy pobieraniu 960 l powietrza	0,18 ÷ 62,5 $\mu\text{g/m}^3$
– przy pobieraniu 720 powietrza	0,25 ÷ 83,3 $\mu\text{g/m}^3$
Granica wykrywalności (LOD), $x_{gw}$	0,6 ng/ml
Granica oznaczania ilościowego (LOQ), $x_{ozn}$	1,8 ng/ml
Współczynnik korelacji, $R$	0,996
Całkowita precyzja oznaczania, $V_c$	6,25
Niepewność całkowita metody, $U_T$ , %	13,35
Niepewność rozszerzona, $U$ , %	26,71

**Tabela 7.**  
**Wyniki badania precyzji oznaczania cisplatyny (CP)**

Powierzchnia pików wg wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia z powierzchni	Powierzchnia pików wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia z powierzchni	Powierzchnia pików wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia z powierzchni	Powierzchnia pików wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia z powierzchni
I seria – roztwór o stężeniu 10 µg/ml		II seria – roztwór o stężeniu 6 µg/ml		III seria – roztwór o stężeniu 1,5 µg/ml		IV seria – roztwór o stężeniu 0,03 µg/ml	
19 766 878 20 364 878 21 578 416 21 478 549 22 584 796 21 457 841 21 548 791 22 548 763	20 065 878  21 528 483  22 021 319  22 048 777	13 788 408 13 616 749 13 420 946 13 208 177 13 631 441 13 208 177 13 420 946 13 788 408	13 702 579  13 314 562  13 419 809  13 604 677	3 982 650 3 981 532 3 988 477 3 994 381 3 995 148 3 980 935 3 968 938 3 953 190	3 982 091  3 991 429  3 988 042  3 961 064	123 268 112 548 114 787 129 874 124 478 112 354 114 567 125 477	117 908  122 331  118 416  120 022
Średnia powierzchnia pików	21 416 114	średnia powierzchnia pików	13 510 407	średnia powierzchnia pików	3 980 656	średnia powierzchnia pików	119 669
Odchylenie standardowe, <i>S</i>	965 355,03	odchylenie standardowe, <i>S</i>	232 753,53	odchylenie standardowe, <i>S</i>	13 918,52	odchylenie standardowe, <i>S</i>	6 845,61
Współczynnik zmienności, <i>n</i> <sub>1</sub> , %	4,51	współczynnik zmienności, <i>n</i> <sub>1</sub> , %	1,72	współczynnik zmienności, <i>n</i> <sub>2</sub> , %	0,35	współczynnik zmienności, <i>n</i> <sub>3</sub> , %	5,72
Średnia precyzja średni współczynnik zmienności dla zakresu, <i>n</i> <sub>zakresu</sub> , %			3,75				
Całkowita precyzja oznaczania – średni współczynnik zmienności, <i>n</i> <sub>c</sub> , %			6,25				

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano selektywną metodę oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy cisplatyny (CP), po przeprowadzeniu jej w pochodną dietylotiokarbaminianu oraz zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS).

Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtr z włókna szklanego umieszczony w próbniku do pobierania frakcji wdychalnej aerozolu, z którego cisplatynę ekstrahowano wodą destylowaną, a następnie przeprowadzano w pochodną z NaDDTC. Do oznaczania pochodnej cisplatyny zastosowano kolumnę analityczną C-18 wypełnioną modyfikowanym żelazem krzemionkowym, którą eluowano mie-

szaniną metanolu z wodą w stosunku 20: 80 (v/v). Ustalone warunki wyodrębniania cisplatyny z powietrza i analizy chromatograficznej uzyskanej pochodnej pozwalają na oznaczanie cisplatyny w obecności innych substancji występujących w powietrzu na różnych etapach produkcji i stosowania leku.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono zakres pomiarowy dla krzywej kalibracji 0,03 ÷ 10 µg/ml, co dało zakres stężeń 0,18 ÷ 62,5 µg/m<sup>3</sup>, gdy pobierano 960 l powietrza oraz 0,25 ÷ 83,3 µg/m<sup>3</sup>, gdy pobierano 720 l. W tym zakresie pomiarowym uzyskana krzywa kalibracji miała przebieg liniowy, o czym świadczy współczynnik regresji na poziomie 0,996. Całkowita precyzja bada-

nia wynosiła 6,25%, a niepewność rozszerzona metody była na poziomie 27,71.

Uzyskane wyniki i parametry walidacyjne potwierdzają przydatność opracowanej metody oznaczania cisplatyny do oznaczania stężeń tej substancji chemicznej w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia zawodowego w szerokim zakresie stężeń  $0,18 \div 62,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  przy pobieraniu 960 l powietrza, ze względu na wykorzystanie opracowanej metody do badania przenikalności cytostatyku przez odzież ochronną.

Zapisana w załączniku w postaci procedury analitycznej metoda oznaczania cisplatyny w powietrzu na stanowiskach pracy została przygotowana w węższym niż prowadzono badania zakresie pomiarowym, a mianowicie  $0,03 \div 0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Zakres ten odpowiada zakresowi

$0,1 \div 1,6$  wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) przy pobieraniu 960 l powietrza i  $0,125 \div 2$  wartości NDS przy pobieraniu 720 l powietrza.

Opracowana metoda oznaczania stężeń cisplatyny może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy do wykonywania pomiarów stężeń tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia pracowników i oceny ryzyka zawodowego stwarzanego przez tę substancję. Wyniki tej oceny będą stanowiły podstawę do podejmowania odpowiednich działań profilaktycznych w zakładach farmaceutycznych przy produkcji cisplatyny, a także w placówkach służby zdrowia i aptekach.

## PIŚMIENNICTWO

- Anupama M., Deepak C., Neeraj K.* (2007) HPLC method for the determination of carboplatin and paclitaxel with cremophorel in an amphiphilic polymer matrix. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 855, 211–9.
- Basotra M., Singh S.K., Gulati M.* (2013) Development and validation of a simple and sensitive spectrometric method for estimation of cisplatin hydrochloride in tablet dosage forms: application to dissolution studies. *Analytical Chemistry Article ID 936254*, 8.
- Bosch M.E., S'anchez A.J.R., Rojas F.S., Ojeda C.B.* (2008) Analytical methodologies for the determination of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 47, no. 3, 451–459.
- CAREX Database [<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/R-830.pdf>].
- Couch J., Burr G.* (2010) Evaluation of exposures to healthcare personnel from cisplatin during a mock interperitoneal operation. *Health Hazard Evaluation Report HETA 2009-0121-3106*. Las Vegas, University Medical Center, March.
- Indeks leków Medycyny Praktycznej (2005) Kraków, Medycyna Praktyczna.
- Kaushik K.H., Sripuram Vijay K., Bedada S., Reddy N.Y., Priyadarshini G.I., Devarakond K.R.* (2010) A simple and sensitive validated HPLC method for quantitative determination of cisplatin in human plasma. *Clinical Research and Regulatory Affairs* 27(1), 1–6.
- Kompendium farmakologii (2006) [Red.:] W. Janiec. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Leki przeciwnowotworowe (2005) [W:] Farmakologia Goodmana & Gilmana [Red.:] L.L. Brunton, J.S. Laza, K.L. Parker. Warszawa, Wydawnictwo: Czelej.
- Tezcan S., Ozdemir F., Turhal S., Izzettin F.V.* (2013) High performance liquid chromatographic determination of free cisplatin in different cancer types. *Der Pharma Chemica* 5(5), 169–174.
- Walusiak-Skorupa J., Wągrowaska-Koski E., Pałczyński C.* (2009) Cytostatyki. Narażenie zawodowe. Skutki zdrowotne. Profilaktyka. Orzecznictwo. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.
- PN-EN 482: 2012 Powietrze na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.
- Rozporządzenie ministra pracy i polityki społecznej z dnia 6.06. 2014 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU, poz. 817.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18.12. 2006 r. nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz. Urz. WE L 396 z dnia 30.12.2006, 1-794 ze zm.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. UE nr L 353 z dnia 31.12.2008 r., 1–1355 ze zm.



## PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA CISPLATYNY W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

### 1. Zakres metody

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości cisplatyny (CAS: 15663-27-1), w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie cisplatyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi około 0,18  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  przy pobraniu 960 l (0,96  $\text{m}^3$ ) powietrza.

### 2. Powołania normatywne

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

### 3. Zasada metody

Metoda polega na: przepuszczeniu badanego powietrza przez filtr z włókna szklanego, wymyciu osadzonej na filtrze cisplatyny wodą destylowaną, przeprowadzeniu jej w pochodną w wyniku reakcji z dietylotiokarbaminianem sodu i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

### 4. Odczynniki, roztwory i materiały

Do analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować substancje 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 0,0002 g.

Wszystkie czynności związane z: przygotowaniem roztworów wzorcowych, wyznaczaniem współczynnika odzysku i przygotowaniem próbek do badań, należy wykonywać w komorze laminarnej lub w przypadku jej braku pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Pracownik powinien być wyposażony w jednorazowe środki ochrony indywidualnej: 2 pary rękawic ochronnych, odzież ochronną i półmaskę.

Zużyte roztwory i odczynniki oraz środki ochrony indywidualnej należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się utylizacją środków medycznych.

#### 4.1. Cisplatyna

Stosować wzorzec wg Farmakopei Europejskiej.

#### 4.2. Metanol

#### 4.3. Dietylotiokarbaminian sodu trihydrat (NaDDTC)

Stosować 4-procentowy roztwór dietylotiokarbaminianu sodu w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu.

#### 4.4. Roztwór wzorcowy podstawowy cisplatyny

Odważyć około 10 mg cisplatyny i przenieść do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełnić do kreski wodą i zawartość dokładnie wymieszać. Obliczyć dokładną zawartość cisplatyny w 1 ml roztworu. Zawartość cisplatyny w 1 ml tak przygotowanego roztworu wynosi około 1 mg. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

#### 4.5. Roztwór roboczy pośredni

Do kolby miarowej o objętości 10 ml odmierzyć 10  $\mu\text{l}$  roztworu podstawowego cisplatyny i uzu-

pełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi około 1 µg/ml. Obliczyć dokładną zawartość cisplatyny w 1 ml roztworów.

#### 4.6. Roztwory wzorcowe robocze

Do kolb miarowych o objętości 1 ml odmierzyć: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 i 0,5 ml roztworu pośredniego, następnie do każdej kolby dodać po 0,5 ml 4-procentowego roztworu soli sodowej dietylotiokarbaminianu (NaDDTC) w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu (NaOH) wg punktu 4.3. i dopełnić wodą do kreski. Zawartość cisplatyny w tak przygotowanych roztworach wzorcach wynosi odpowiednio około: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 µg. Obliczyć dokładną zawartość cisplatyny w 1 ml roztworów.

#### 4.5. Roztwór wzorcowy do wyznaczenia współczynnika odzysku

Do kolby miarowej o objętości 10 ml odmierzyć 1 ml roztworu podstawowego cisplatyny i dopełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi około 100 µg/ml. Obliczyć dokładną zawartość cisplatyny w 1 ml roztworów.

#### 4.6. Filtry

Stosować dostępne w handlu filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm.

### 5. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny.

#### 5.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym.

#### 5.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną umożliwiającą selektywne oznaczanie pochodnej cisplatyny, np.: kolumnę o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, wypełnioną fazą oktadecylową o uziarnieniu 5 µm.

#### 5.3. Próbniki do pobierania próbek powietrza

Stosować próbki zapewniające wyodrębnienie frakcji wdychanej aerozolu.

#### 5.4. Strzykawki do cieczy

Strzykawki do cieczy o pojemności od 5 µl do 2,5 ml.

#### 5.5. Kolby Elenmayera

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

#### 5.6. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 6.

#### 5.7. Płaszcz grzejny

Stosować płaszcz grzejny umożliwiający utrzymanie stałej temperatury 37 °C.

#### 5.8. Wyrząsarka mechaniczna

Stosować wyrząsarkę mechaniczną.

### 6. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-Z-0-4008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 4.8. umieszczony w próbniku wg punktu 5.3., przepuścić 720 ÷ 960 l (0,72 ÷ 0,96 m<sup>3</sup>) badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min (zgodnie z instrukcją próbnika stosowanego do wyodrębniania frakcji wdychanej aerozolu).

Pobrane próbki, przechowywane w temperaturze około 20 °C, zachowują trwałość przez 24 h.

### 7. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy chromatografu należy tak dobrać, aby uzyskać rozdział pochodnej cisplatyny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 5.2., oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

- faza ruchoma –  
metanol: woda 80: 20
- natężenie przepływu  
strumienia fazy ruchomej 1 ml/min
- temperatura kolumny 23 ÷ 24 °C
- długość fali analitycznej  
detektora diodowego 254 nm
- objętość dozowanej próbki 80 µl.



## 8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Kolby miarowe z roztworami wzorcowymi roboczymi wg punktu 4.6. umieścić w płaszczu grzejnym o temperaturze 37 °C na 45 min. Następnie ochłodzić roztwory do temperatury pokojowej i wprowadzić do chromatografu za pomocą pętli dozowniczej po 80 µl roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 4.6. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. 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 zawartość cisplatyny w roztworach wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

## 9. Wyznaczanie współczynnika odzysku

W pięciu kolbach wg punktu 5.5. umieścić filtry z włókna szklanego i następnie dodać po 50 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku wg punktu 4.7. mikrostrzykawką o pojemności 50 µl wg punktu 5.4. W szóstej kolbie przygotować próbkę kontrolną zawierającą czysty filtr. Kolby szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać po 3 ml wody wg punktu 5.4. i wstrząsać zawartością kolb przez 30 min, stosując wytrząsarkę wg punktu 5.8.

Jednocześnie wykonać oznaczanie badanej substancji, co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 3 ml wody po 50 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku wg punktu 4.7. Oznaczanie badanej substancji wykonać wg punktu 10.

Współczynnik odzysku cisplatyny ( $d$ ) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

$P_d$  – średnia powierzchnia pików pochodnej cisplatyny na chromatogramach roztworów po desorpcji,

$P_o$  – średnia powierzchnia pików o czasie retencji pochodnej cisplatyny na chromatogramach roztworu kontrolnego,

$P_p$  – średnia powierzchnia pików pochodnej cisplatyny na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku pochodnej cisplatyny ( $\bar{d}$ ) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości ( $d$ ).

Współczynnik odzysku należy zawsze oznaczać dla każdej nowej partii stosowanych do pochłaniania filtrów z włókna szklanego.

## 10. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza filtr przenieść do kolby wg punktu 5.5. Następnie dodać 3 ml wody, kolbę zamknąć i wstrząsać zawartością kolb przez 30 min, stosując wytrząsarkę wg punktu 5.8. Następnie pobrać 0,5 ml roztworu z nad filtra, wprowadzić do kolby miarowej o pojemności 1 ml i dodać 0,5 ml 4-procentowego roztworu soli sodowej dietylotiokarbaminianu (NaDDTC) w 0,01 (mol)/l wodorotlenku sodu (NaOH) wg punktu 4.3. i dopełnić wodą do kreski. Kolbę umieścić w płaszczu grzejnym wg punktu 5.7. o temperaturze 37 °C na 45 min. Następnie pobrać 80 µl roztworu pochodnej cisplatyny i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 7. Wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików pochodnej cisplatyny według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną.

Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość cisplatyny w 0,5 ml badanego roztworu znad filtra odczytać z wykresu krzywej wzorcowej, w mikrogramach.

### 11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie cisplatyny ( $X$ ) w badanym powietrzu obliczyć, w mikrogramach na metr sześcienny, wg wzoru:

$$X = \frac{6 \cdot m}{V},$$

w którym:

- $m$  – zawartość cisplatyny w 0,5 ml roztworu uzyskanego po wymyciu filtra, odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,
- $V$  – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w metrach sześciennych,
- 6 – współczynnik przeliczeniowy wynikający z objętości roztworu użytego do wymywania z filtra (3 ml) i użytego do analizy (0,5 ml).