

# Cyklofosfamid

## Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy<sup>1</sup>

### Cyclophosphamide

### Determination method in workplace air

*mgr* MARZENA BONCZAROWSKA  
*e-mail:* marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl  
*dr* SŁAWOMIR BRZEŹNICKI  
*e-mail:* slawomir.brzeznicki@imp.lodz.pl  
Instytut Medycyny Pracy  
*im. prof. dr. med. Jerzego Nofera*  
91-348 Łódź  
*ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8*

**Numer CAS** 50-18-0

**Słowa kluczowe:** cyklofosfamid, cytostatyki, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy.

**Keywords:** cyclophosphamide, cytostatics, analytical method, liquid chromatography, workplace air.

#### Streszczenie

Cyklofosfamid (CP) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białego, bezwonnego proszku. Związek ten stosuje się głównie jako lek w terapii chorób nowotworowych. Szkodliwe działanie cyklofosfamidu w warunkach ostrego narażenia polega na: uszkodzeniu szpiku kostnego, krwotocznym uszkodzeniu pęcherza oraz działaniu kardiotoksycznym. Związek ten wykazuje również negatywny wpływ na rozrodczość. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) sklasyfikowała cyklofosfamid jako związek rakotwórczy dla ludzi (grupa 1.). W Unii Europejskiej cyklofosfamid został zaklasyfikowany jako związek rakotwórczy kategorii 1.A i mutageny kategorii 2.B. Narażenie zawodowe na cyklofosfamid występuje podczas produkcji leku lub w trakcie jego podawania w oddziałach

onkologicznych. Podczas produkcji cyklofosfamidu głównymi drogami narażenia zawodowego są układ oddechowy i skóra.

Celem pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania stężeń cyklofosfamidu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od 1/10 do 2 zaproponowanej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN-482+A1: 2016-01.

Do badań wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas. Rozdziałów chromatograficznych dokonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 150 x 3 mm o uziarnieniu 5 µm, którą wymywano mieszaniną metanolu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego.

<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 badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Naukowego Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w powietrzu cyklofosfamid (CP) na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny metanol: woda z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu. Zaproponowany sposób ekstrakcji cyklofosfamid z filtrów umożliwia pełny odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku wynosi 90%. Zależność wskazań detektora mas w funkcji stężeń cyklofosfamid ma charakter liniowy ( $r = 0,999$ ) w zakresie stężeń  $0,01 \div 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego wynoszą odpowiednio  $0,00046$  i  $0,00154 \mu\text{g/ml}$ .

Zastosowanie w oznaczeniach tandemowego spektrometru mas pozwala na selektywne i specyficzne oznaczenie cyklofosfamid w obecności innych leków cytostatycznych.

Opisana w niniejszym artykule metoda zapewnia możliwość oznaczenia cyklofosfamid na poziomie  $0,0004 \text{ mg/m}^3$ , tj. na poziomie 1/25 zaproponowanej wartości NDS.

Zapisana w formie przepisu analitycznego metodę oznaczania cyklofosfamid – spełniającą wymagania zawarte w normie PN-EN-482+A1:2016-01, zamieszczono w załączniku.

### Summary

Cyclophosphamide (CP) at room temperature is a fine white crystalline odorless powder. It is used mainly as a cytostatic drug in anticancer therapy. Acute exposure to CP can cause bone marrow damage, hemorrhagic cystitis and cardiomyopathy. Cyclophosphamide has a negative influence on reproducibility in humans. International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified CP as carcinogenic to humans (Group 1). In the European Union, cyclophosphamide has been classified as carcinogenic category 1.A and mutagenic category 2.B. Occupational exposure to CP may occur during its production and during preparation and application of CP in oncology wards. Cyclophosphamide may be absorbed mainly by inhalation or skin contact.

The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for determining cyclophosphamide concentrations in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of Standard No. PN-EN 482.

The study was performed using a liquid chromatograph with a tandem mass detection (HPLC-MS/MS). All chromatographic analyses were performed with Supelcosil LC 18  $150 \times 3 \text{ mm}$  analytical column, which was eluted with a mixture of methanol and water with 0.1% of formic acid.

The method was based on collecting CP on glass fiber filter, extracting with a mixture of methanol: water with addition of formic acid (0.1%), and chromatographic determining of resulted solution with HPLC-MS/MS technique. The average extraction efficiency of CP from filters was 90%. The method was linear ( $r = 0.999$ ) within the investigated working range  $0.01 - 0.5 \mu\text{g/ml}$ . The calculated limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were  $0.00046$  and  $0.0015 \mu\text{g/ml}$ , respectively.

The analytical method described in this paper, thanks to HPLC-MS/MS technique, enables specific and selective determination of CP in workplace air in the presence of other compounds at concentrations from  $0.0004 \text{ mg/m}^3$  (1/25 proposed MAC value). The method precise, accurate and it meets the criteria for measuring chemical agents listed in Standard No. PN-EN 482. The method can be used for assessing occupational exposure to CP and associated risk to workers' health. The developed method of determining CP has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

## WPROWADZENIE

Cyklofosfamid (CP) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białego, bezwonnego proszku. Jest substancją dobrze rozpuszczalną w wodzie ( $40 \text{ g/l}$  w temp.  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Cyklofosfamid dobrze rozpuszcza się w: etanolu ( $100 \text{ mg/ml}$ ), chloroformie, dioksanie oraz glikolach, słabo – w benzenie i tetrachloru

węgla, bardzo słabo – w eterze etylowym oraz acetonie. Na skalę przemysłową związek ten jest otrzymywany w wyniku reakcji dichloru *N,N*-bis (B-chloroetylo)fosfamid z propanoloaminą w obecności trimetyloaminy i dioksanu.

Cyklofosfamid stosuje się głównie jako lek w terapii chorób nowotworowych. Wykazuje działanie cytostatyczne oraz immunosupresyjne. Lek jest stosowany w leczeniu: ziarnicy złośliwej, przewlekłej białaczki limfatycznej, raka jajnika, nieoperacyjnego raka sutka oraz nabłoniaka oskrzeli. Jako środek immunosupresyjny cyklofosfamid jest stosowany w leczeniu: zespołu nerczycowego, liszaja rumieniowatego, reumatoidalnego zapalenia stawów, niedokrwistości immunohemolitycznych oraz podczas transplantacji nerek i szpiku.

Szkodliwe działanie cyklofosfamidu w warunkach narażenia ostrego powoduje: uszkodzenie szpiku kostnego, krwotoczne uszkodzenie pęcherza oraz działanie kardiotoxyczne. Związek ten wykazuje również negatywny wpływ na rozrodczość, powodując zaburzenia płodności i zaburzenia cyklu miesięczkowego (Gromiec 2015; HSDB 2003).

Grupa Ekspertów ds. Badań nad Rakiem (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) zaliczyła związek do grupy 1. (uznany kancerogen dla ludzi), (IARC 2012). W Unii Europejskiej cyklofosfamid został zaklasyfikowany jako związek rakotwórczy kategorii 1.A i mutageny kategorii 2.B. W badaniach na zwierzętach stwierdzono również genotoksyczne i teratogenne działanie tego związku.

W warunkach narażenia zawodowego cyklofosfamid do organizmu człowieka może dostawać się głównie drogą inhalacyjną oraz przez skórę (Fransman i in. 2007; Sessink i in. 1994). Zawodowe narażenie na cyklofosfamid dotyczy w szczególności pracowników służby zdrowia (farmaceutów, pielęgniarek, lekarzy, salowych) oraz osób świadczących usługi dla służby zdrowia (np. pracowników pralni lub firm przetwarzających odpady). Czynności związane z: przygotowaniem

preparatów w aptekach szpitalnych, otwieraniem ampulek, aplikacją leków pacjentom, a także kontakt z materiałem biologicznym, brudną odzieżą szpitalną oraz z zanieczyszczoną powierzchnią blatów lub podłogi stanowią ryzyko narażenia (Mason i in. 2005; Pretty i in. 2012). Cyklofosfamid jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii przeciwnowotworowej. Liczba osób potencjalnie narażonych w Polsce na cyklofosfamid może dochodzić do kilku tysięcy osób.

Zgodnie z tabelą 3.2. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwanego rozporządzeniem CLP (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r., L 353, 1–1355 ze zm.) cyklofosfamid jest zaklasyfikowany jako substancja toksyczna i oznaczona: T; R25 i R45. Symbole te informują o tym, że cyklofosfamid:

- T – jest substancją toksyczną
- R25 – działa toksycznie po połknięciu
- R45 – może powodować raka.

Zharmonizowaną klasyfikację oraz oznakowanie cyklofosfamidu, zgodnie z wymaganiami zawartymi w tabeli 3.1. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE), przedstawiono w tabeli 1.

Celem pracy było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania cyklofosfamidu w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary jego stężeń, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego.

**Tabela 1.**  
**Klasyfikacja i oznakowanie cyklofosfamidu (CP)**

Klasyfikacja	Oznakowanie
Acute Tox. 3 – toksyczność ostra (kat. 3.)	H301 – działa toksycznie po połknięciu
Carc. 1A – rakotwórczość (kat. 1.A)	H 350 – może powodować raka
Germ cell mut 1B – działanie mutagenne na komórki rozrodcze (kat. 2.B)	H340 – może powodować wady genetyczne
Repr. – działanie szkodliwe na rozrodczość	H362 – może działać szkodliwie na dzieci karmione piersią
Skin Irrit. 2 – działanie drażniące na skórę (kat. 2.)	H315 – działa drażniąco na skórę

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Materiały i odczynniki

W badaniach zastosowano:

- kwas mrówkowy (POCH)
- metanol do LC-MS (JT Baker)
- wzorzec cyklofosfamid (Fluka)
- wodę o czystości do HPLC pochodzącą ze stacji uzdatniania wody firmy Millipore.

Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry z włókna szklanego Whatman GF/A. Roztwory przygotowano, stosując szkło miarowe klasy A (kolby, pipety szklane) oraz pipety automatyczne.

### Aparatura

Do badań wykorzystano: chromatograf cieczowy firmy Waters model Alliance 2695 LC System wyposażony w poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, automatyczny dozownik próbek, termostat kolumny analitycznej, komputer z programem sterowania i akwizycji danych (Mass-Lynx 4.0), kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 150 × 3 mm, 5 μm wypełnioną fazą okta-decyłową (C-18). Do detekcji wykorzystano sprzężony z chromatografem tandemowy spektrometr mas *micromass quattro micro* API. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory indywidualne EHA – Air 350. Do odważania substancji wzorcowych stosowano wagę analityczną Sartorius Research, a do ekstrakcji próbek – mieszadło rolkowe.

### Warunki oznaczania chromatograficznego

Przegląd piśmiennictwa wykazał, że do oznaczania cyklofosfamid w powietrzu są stosowane takie techniki chromatograficzne, jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV), (Ahmad i in. 2011; Castiglia i in. 2008; Larson i in. 2003; Martins i in. 2009), wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową detekcją mas (HPLC/MS/MS), (Sabatini i in. 2005; da Silva i in. 2016; Shu i in. 2016) oraz chromatografia gazowa z detekcją mas (GC/MS), (Lekskulachai 2016; Mason i in. 2005). Pierwsza z wymienionych technik nie zapewnia

(dla zaproponowanej wartości NDS) możliwości uzyskania odpowiedniej czułości oznaczeń. Z kolei zastosowanie GC/MS wymaga etapu derywatywacji cyklofosfamid przed analizą instrumentalną (Lekskulachai 2016). Trzecia z wymienionych technik (HPLC/MS/MS) pozwala na uzyskanie odpowiedniej czułości oznaczeń. Zastosowanie tandemowego spektrometru mas zapewnia możliwość selektywnego oznaczania cyklofosfamid w próbce (Sabatini i in. 2005).

Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy cyklofosfamid techniką LC-MS/MS wykonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 150 × 3,0 mm, ziarno 5 μm. Jako fazę ruchomą (elucja izokratyczna) zastosowano mieszaninę metanolu i wody z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego. Optymalizacji poddano następujące parametry pracy detektora mas:

- napięcia: kapilary, sondy ESI, źródła jonów, ekstraktora i soczewek
- temperatury: desolwatacji i źródła jonów
- przepływu gazów
- pracy komory kolizyjnej.

Charakterystyczna dla cyklofosfamid fragmentacja w komorze kolizyjnej jonu molekularnego tego związku ( $M+H^+$ ,  $m/z$  261) do jonu potomnego ( $m/z$  140) została dobrana na podstawie danych z piśmiennictwa (Sabatini 2005).

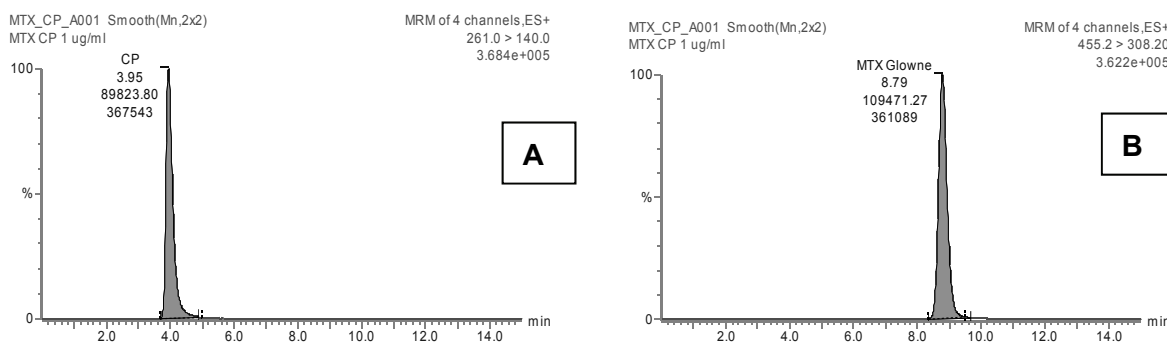
Optymalne warunki pracy stosowanego podczas opracowywania metody zestawu LC-MS/MS podano w tabeli 2. Zastosowanie tandemowego spektrometru mas zapewnia w danych warunkach analitycznych selektywność oznaczeń cyklofosfamid w przypadku obecności innych cytostatyków. Analit po rozdzieleniu na kolumnie chromatograficznej jest wprowadzany przez sondę ESI (*electrospray ionisation*) do tandemowego spektrometru mas (MS/MS), gdzie ulega jonizacji, a następnie fragmentacji w komorze kolizyjnej. Jon molekularny cyklofosfamid ( $M+H^+$ ,  $m/z$  261) ulega fragmentacji w komorze kolizyjnej, w wyniku czego powstaje jon potomny ( $m/z$  140). Jony są rozdzielane w polu elektromagnetycznym filtra kwadrupolowego w zależności od stosunku masy do ładunku, a następnie rejestrowane przez detektor. W danych warunkach pracy spektrometru mas

i w tym samym czasie retencji inny związek nie powinien podlegać fragmentacji charakterystycznej dla cyklofosfamidu. Przykładowy chromatogram

mieszaniny cyklofosfamidu i metotreksatu przedstawiono na rysunku 1.

**Tabela 2.**  
**Warunki pracy chromatografu**

Kolumna analityczna Supelcosil™ LC-18-150 x 3 mm x 5 μm	
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w metanolu (A) ÷ 0,1-procentowy kwas mrówkowy w wodzie (B) 6 ÷ 4 (A: B)
Warunki pracy spektrometru	jonizacja ES +
Fragmentacja jonów: tryb MRM ( <i>multiple reaction monitoring</i> )	napięcie kapilary 3,0 kV
CP: 261 → 140	napięcie źródła jonów 27 V
	napięcie ekstraktora 2 V
	napięcie soczewek RF 0,1 V
	temperatura źródła jonów 110 °C
	temperatura desolwacji 350 °C
	przepływ azotu w źródle jonów 1 l/h
	przepływ azotu desolwacji 600 l/h
	rozdzielczość LM/HM 1 13/12
	energia jonów 1 1,0
	komora kolizyjna:
	– energia wejścia 1
	– energia kolizji 22
	– energia wyjścia 1
	rozkład LM/HM 2 13/12
	energia jonów 2 1,0
	ciśnienie gazu kolizyjnego $3,5 \cdot 10^{-3}$ mbar
Strumień objętości fazy ruchomej	0,3 ml/min
Temperatura kolumny	40 °C
Objętość próbki	10 μl



**Rys. 1.** Specyficzność oznaczeń cyklofosfamidu (CP) i metotreksatu (MTX) w zależności od warunków pracy spektrometru mas w trybie rejestracji wybranych jonów potomnych. CP – 261 – 140 m/z (A) i MTX – 455,2 – 308,2 m/z (B)

### Badanie warunków pobierania, ekstrakcji i przechowywania próbek powietrza do oznaczeń cyklofosfamidu

Zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN-482+A1: 2016-01 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy

powinna być zwalidowana dla zakresu już od 1/10 ÷ 2 wartości obowiązującego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Próbki powietrza do oznaczania cyklofosfamidu należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie PN-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą w normie PN-Z-04008-7:2002/Az1: 2004).

Cyklofosfamid może występować w powietrzu stanowisk pracy głównie w postaci cząstek stałych bądź w postaci aerozolu ciekłego. Przegląd piśmiennictwa dotyczący oznaczania cytotatyków w powietrzu wykazał, że najczęściej stosowanym do tego celu medium pochłaniającym są filtry z włókna szklanego (Mason i in. 2005; Yoshida i in. 2010). W niektórych publikacjach znaleziono informacje o możliwej sublimacji cyklofosfamidu (Odraska i in. 2011). Z tego względu zdecydowano o sprawdzeniu możliwości sublimacji tego związku z powierzchni w podwyższonej temperaturze lub sublimacji z filtrów szklanych podczas pobierania próbek powietrza. W tym celu przygotowano roztwór cyklofosfamidu o stężeniu 100 µg/ml, 0,1 ml tego roztworu przeniesiono na dno kolby stożkowej. Po odparowaniu rozpuszczalnika do kolby wprowadzono rurkę zawierającą 60 mg sorbentu Strata-X. Wylot kolby uszczelniono, zapewniając możliwość wyrównania ciśnienia, natomiast próbnik podłączono do aspiratora EHA Air-350. Kolbę umieszczono na płycie grzejnej o temperaturze około 40 °C. Przez próbnik przepuszczono około 50 l powietrza ze strumieniem objętości 250 ml/min. Po zakończeniu pobierania sorbent z rurek przenoszono do wial o pojemności 2 ml, a następnie poddano ekstrakcji za pomocą mieszaniny metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i ultradźwięków. Otrzymane ekstrakty poddano analizie chromatograficznej celem określenia stopnia sublimacji cyklofosfamidu w podwyższonej temperaturze.

Badania odzysku cyklofosfamidu z filtrów poddanych aeracji wykonano, przygotowując trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych cyklofosfamidu o stężeniach: 5; 20 i 100 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, filtry umieszczono w głowicach do pobierania próbek powietrza, z którymi szeregowo połączono rurki sorpcyjne wypełnione sorbentem Strata-X. Przez zestaw przepuszczono powietrze ze strumieniem objętości

około 250 ml/min (przez 200 min), stosując aspiratory indywidualne. Po tym czasie filtry i sorbent przenoszono oddzielnie do wial o pojemności 4 ml, a następnie dodawano po 2 ml mieszaniny ekstrakcyjnej i ekstrahowano przez 30 min za pomocą mieszadła rolkowego (filtry) i łaźni ultradźwiękowej (sorbent). Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE i poddawano analizie chromatograficznej. Takiej samej procedurze poddano złożę wypełniające rurki. W celu sprawdzenia powstania strat analitu podczas aeracji, wielkości pól powierzchni pików uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów, na które naniesiono takie same stężenia cyklofosfamidu, ale nie poddano aeracji.

Badanie możliwości sublimacji cyklofosfamidu z powierzchni wykazało, że podwyższenie temperatury otoczenia do 40 °C nie powoduje zmiany stanu skupienia oznaczanego związku. Analiza ekstraktów sorbentu nie wykazała obecności cyklofosfamidu na złożu. Wyniki badania warunków pobierania próbek powietrza w temperaturze 23 i 36 °C przedstawiono w tabelach 3. i 4. Przeprowadzone badania nie wykazały negatywnego wpływu temperatury na możliwość powstawania strat oznaczanego związku. W żadnej rurce z sorbentem polimerowym Strata-X nie zarejestrowano obecności cyklofosfamidu. Nie stwierdzono także istotnych różnic w wartościach współczynników odzysku cyklofosfamidu z filtrów poddanych aeracji w różnych temperaturach. Średnie wartości współczynników odzysku cyklofosfamidu z filtrów poddanych aeracji w temperaturze 23 i 36 °C wynoszą odpowiednio 92,9% (89,6 ÷ 96,9%, CV – 7,5%) i 95,9% (93,2 ÷ 97,9%, CV – 6,4%).

Tabela 3.

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń cyklofosfamidu (CP) pobranego na filtry z włókna szklanego (temperatura 23 °C)

Medium pochłaniające	Zawartość cyklofosfamidu na filtrze, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,05	3086,3	2175,4	78,0	89,6
		2811,3	2691,5	96,6	
		2464,9	26935	96,6	
			2491,5	89,4	
			2370,5	85,0	
			2561,9	91,9	
				<i>SD</i> 7,2	
				<i>CV</i> 8,0	
	0,2	10209,3	9257,7	90,5	92,3
		10538,2	9851,9	96,3	
		9938,5	9534,9	93,2	
			7856,3	76,8	
			10018,6	97,9	
			10111,4	98,9	
				<i>SD</i> 8,2	
				<i>CV</i> 8,9	
	1	51175,0	46251,2	94,9	96,9
		46346,0	48162,4	98,9	
		48619,5	49133,7	100,9	
			48085,0	98,7	
			47558,1	97,6	
			44031,1	90,4	
				<i>SD</i> 3,7	
				<i>CV</i> 3,9	
Średni współczynnik odzysku, $\bar{S}_r$ , %		92,9			
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>		7,0			
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		7,5			

Tabela 4.

Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń cyklofosfamidu (CP) pobranego na filtry z włókna szklanego (temperatura 36 °C)

Medium pochłaniające	Zawartość cyklofosfamidu na filtrze, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,05	2806,2	2433,2	93,8	96,5
		2486,5	2400,2	92,5	
		2490,8	2585,4	99,6	
			2457,9	94,7	
			2286,3	88,1	
			2862,3	110,3	
				<i>SD</i> 7,7	
				<i>CV</i> 8,0	
	0,2	10031,3	9192,5	101,3	97,9
		8590,9	9979,4	109,9	
		8607,5	8272,5	91,1	
			8866,7	97,7	
			8570,3	94,4	
			8415,5	92,7	
				<i>SD</i> 6,9	
				<i>CV</i> 7,1	

cd. tab. 4.

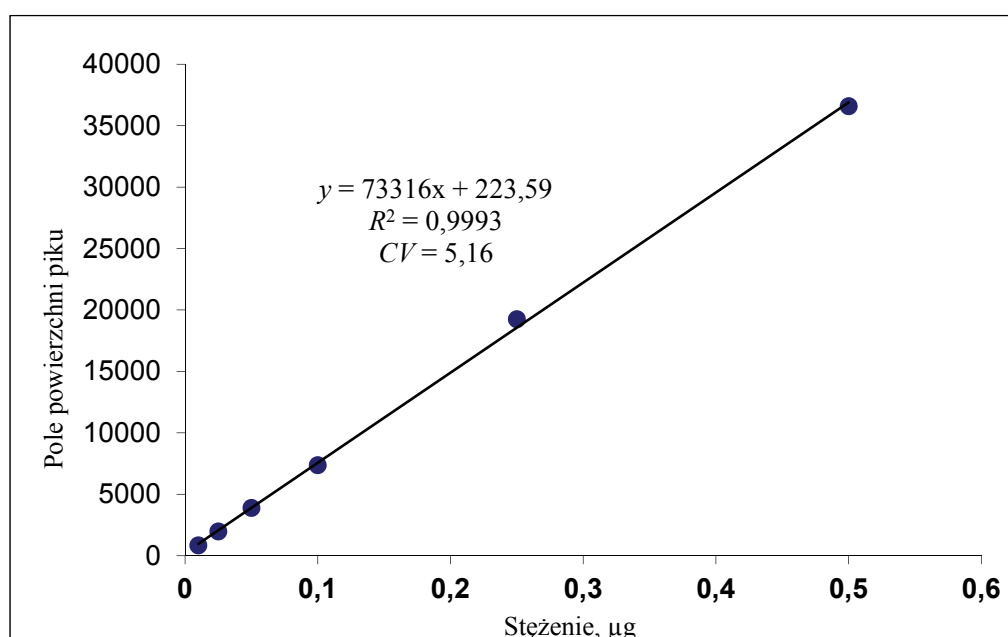
Medium pochłaniające	Zawartość cyklofosfamidu na filtrze, $\mu\text{g}$	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	1	49087,8	42575,8	95,6	93,2
		43113,6	42482,9	95,4	
		41459,9	39885,3	89,5	
			41456,6	93,0	
			41539,6	93,2	
			41153,5	92,4	
			<i>CV</i> 2,4		
Średni współczynnik odzysku, $\bar{S}_r$ , %		95,9			
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>		6,1			
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		6,4			

### Kalibracja i precyzja oznaczeń cyklofosfamidu

Celem określenia zakresu roboczego metody przygotowano trzy serie po siedem filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10  $\mu\text{l}$  roztworów wzorcowych o stężeniach: 0; 2; 5; 10; 20; 50 i 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , co odpowiadało zawartości: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 i 1,0  $\mu\text{g}$  cyklofosfamidu na filtrze. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w wialach o pojemności 4 ml, zalewano 2 ml metanolu i wody (1: 1) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i ekstrahowano za pomocą wytrząsarki rotacyjnej przez

okres 30 min. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE, a następnie poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody w założonym zakresie stężeń przedstawiono graficznie na rysunku 2. Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi detektora od stężenia cyklofosfamidu ma charakter liniowy w zakresie 0,01 ÷ 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Zależność tę opisano równaniem  $y = 73315,7x + 223,6$ . Wyrażony w procentach błąd względny *CV* wynosi 5,2, a współczynnik korelacji „*r*” jest równy 0,999.

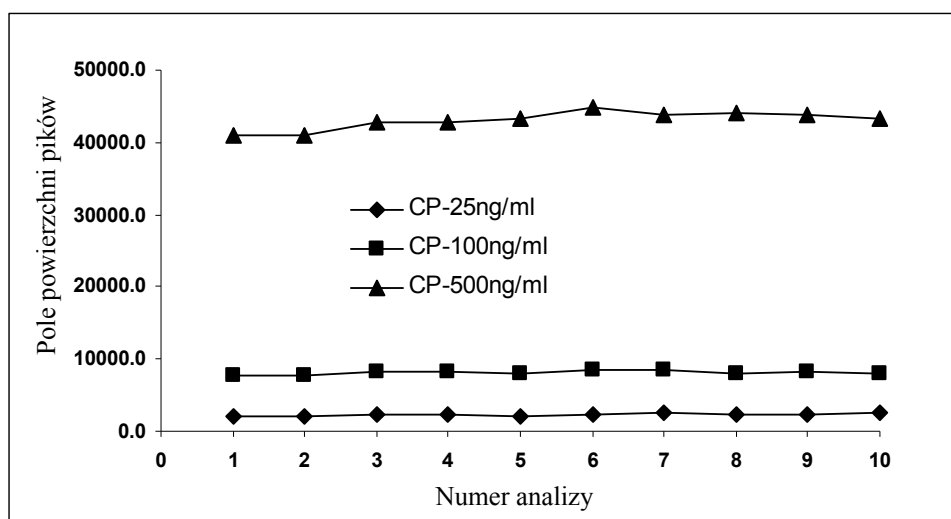


Rys. 2. Krzywa wzorcowa eluatów cyklofosfamidu (CP) z filtrów z włókna szklanego



Celem zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia, przygotowano trzy roztwory wzorcowe cyklofosfamidu o stężeniach: 0,025; 0,1 i 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Roztwory oznaczano chromatograficznie, analizując każdy wzorzec dziesięciokrotnie.

Wyniki badania precyzji metody przedstawiono na rysunku 3. Współczynniki zmienności *CV* rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 25; 100 i 500  $\text{ng}/\text{ml}$  wynoszą odpowiednio: 6,2; 3,4 i 2,9%.



Rys. 3. Precyzja oznaczeń cyklofosfamidu (CP) przy zastosowaniu zestawu LC-MS/MS i kolumny Supelcosil LC-18 150 x 3 mm, z ziarnem 5  $\mu\text{m}$

### Badanie trwałości próbek cyklofosfamidu na filtrach

Celem zbadania trwałości cyklofosfamidu pobranego na filtry z włókna szklanego przygotowano sześć serii po sześć filtrów, na które naniesiono po 10  $\mu\text{l}$  roztworów wzorcowych o stężeniach: 5; 20 i 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Po odparowaniu rozpuszczalnika, filtry umieszczano w hermetycznych pojemnikach i przechowywano w chłodziarce. Po 6, 12 i 18 dniach przechowywania filtry ekstrahowano 2 ml mieszaniny metanolu i wody (1: 1) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE, a następnie poddawano analizie chromatograficznej. Uzyskane wartości pól powierzchni pików cyklofosfamidu porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów przygotowanych w dniu badania.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 5. Zebrane dane wskazują, iż próbki cyklofosfamidu pobrane na filtry z włókna szklanego, umieszczone w hermetycznych pojemnikach i przechowywane w chłodziarce są trwałe nie dłużej niż osiemnaście dni. Po tym okresie przechowywania próbek stwierdzono odpowiednio dla analizowanych ilości cyklofosfamidu (0,05; 0,2; 1  $\mu\text{g}/\text{filtr}$ ): 92,9; 91,7 i 89,4% pierwotnej ilości analitu (średnia 91,3%, *CV* – 4,6%).

**Tabela 5.**  
**Wpływ czasu przechowywania na trwałość cyklofosfamidu (CP)**

Czas przechowywania, dni	Stężenie cyklofosfamidu na filtrze, µg								
	0,05 (% odzysku)			0,2 (% odzysku)			1,0 (% odzysku)		
6	99,1	90,8	92,8	99,2	72,0	93,4	113,6	98,6	95,8
	96,1	99,8	95,0	88,2	90,9	98,9	97,7	94,8	100,9
	Śr 95,6 SD 3,5 CV 3,7			Śr 90,4 SD 10,0 CV 11,1			Śr 100,2 SD 6,9 CV 6,9		
Średni współczynnik odzysku, Śr 95,4% Odchylenie standardowe, S 8,0 Współczynnik zmienności, CV 8,4									
12	74,6	89,3	93,1	90,7	107,1	95,7	99,3	85,0	93,3
	80,3	92,8	91,0	90,1	98,3	98,7	102,9	92,2	86,0
	Śr 86,8 SD 7,6 CV 8,8			Śr 96,8 SD 6,2 CV 6,5			Śr 93,1 SD 7,1 CV 7,6		
Średni współczynnik odzysku, Śr 92,2% Odchylenie standardowe, S 7,8 Współczynnik zmienności, CV 8,6									
18	92,5	95,8	86,9	89,1	98,6	90,1	91,3	93,5	89,5
	98,1	98,0	86,0	88,8	94,4	89,3	86,8	85,9	89,4
	Śr 92,5 SD 5,4 CV 5,8			Śr 91,7 SD 4,0 CV 4,3			Śr 89,4 SD 2,8 CV 3,2		
Średni współczynnik odzysku, Śr 91,3% Odchylenie standardowe, S 4,2 Współczynnik zmienności, CV 4,6									

## Walidacja

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN-482+A1: 2016-01.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

– granica wykrywalności,  
*GW* 0,00046 µg/ml

– granica oznaczalności,  
*GO* 0,00154 µg/ml  
 – współczynnik korelacji, *r* 0,999  
 – całkowita precyzja badania,  
*V<sub>c</sub>* 11,06%  
 – względna niepewność całkowita 28,57%.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania cyklofosfamidu w powietrzu z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Zastosowanie w analizie monitoringu przejścia (rozpadu) jonu molekularnego cyklofosfamidu (m/z 261) w jon potonny

(m/z 140) pozwala na jego selektywne oznaczenie w obecności innych związków.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie stężeń cyklofosfamidu w powietrzu środowiska pracy w zakresie 0,0004 ÷ 0,02 mg/m<sup>3</sup>, tj. od 1/25 do 2 wartości proponowanego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Metoda została poddana

walidacji zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN-482 i opisana w formie procedury analitycznej zamieszczonej w załączniku.

## PIŚMIENNICTWO

- Ahmad M., Usman M., Madni A. i in. (2011). A fast and simple HPLC-UV method for simultaneous determination of three anti-cancer agents in plasma of breast cancer patients and its application to clinical pharmacokinetics Afr. J. Pharm. Pharmacol. 5(7), 915–922.
- Castiglia L., Miraglia N., Pieri M. i in. (2008). Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. J. Occup. Health 50(1), 48–56.
- Fransman W., Huizer D., Tuerk D., Kromhout D. (2007). Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. Int. Arch. Occup. Environ. Health 80, 396–403.
- Gromiec J. (2015). Cyklofosfamid. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 1(83), 17–71.
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2003). Cyclophosphamide [dostęp: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@r+50-18-0>].
- IARC, International Agency for Research for Cancer (2012). Pharmaceuticals. Volume 100A [dostęp: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/>].
- Larson R.R., Khazaeli M.B., Dillon H.K. (2003). Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. Appl. Occup. Environ. Hyg. 18(2), 109–19.
- Lekskulachai V. (2016). Quantitation of anticancer drugs – cyclophosphamide and ifosfamide in urine and water sewage samples by gas chromatography – mass spectrometry. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health 29 (5), 815–822.
- Martins I., Souza J.O., Sanson A.L. (2009). Simultaneous determination of cyclophosphamide and ifosfamide in plasma using SPE-HPLC-UV method. Lat. Am. J. Pharm. 28 (1), 41–6.
- Mason H.J., Blair S., Sams C. i in. (2005). Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. Ann. Occup. Hyg. 49, No. 7, 603–610.
- Odraska P., Dolezalova L., Piler P. i in. (2011). Utilization of the solid sorbent media in monitoring of airborne cyclophosphamide concentration and the implications for occupational hygiene. J. Environ. Monit. 13, 1480.
- PN-EN-482+A1: 2016-01 Powietrze na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.
- PN-Z-04008-7:2002. Az 1: 2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.
- Pretty J.R., Connor T.H., Spasojevic I. i in. (2012). Sampling and mass spectrometric analytical methods for five antineoplastic drugs in the healthcare environment. J. Oncol. Pharm. Pract. 18(1), 23–36.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji oraz mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r. (L 353), 1–1355 z późn. zm.
- Sabatini L., Barbieri A., Tosi M. i in. (2005). A new high-performance liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. J. Mass. Spectrom. 40, 669–674.
- Sessink P.J., van de Kerkhof M.C., Anzion R.B. i in. (1994). Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? Arch. Environ. Health 49(3), 165–9.
- Shu C., Zeng T., Gao S. i in. (2016). LC-MS/MS method for simultaneous determination of thalidomide, lenalidomide, cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone and adriamycin in serum of multiple myeloma patients. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 1028, 111–9.
- da Silva C.B., Julio I.P., Donadel G.E., Martins I. (2016). UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil in surface samples. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 82, 68–73.
- Yoshida J., Kods S., Nishida S. i in. (2010). Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. J. Oncol. Pharm. Practice 17(1), 29–38.



## PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA CYKLOFOSFAMIDU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

### 1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń cyklofosfamidu (CAS:50-18-20) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie cyklofosfamidu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,0004 mg/m<sup>3</sup>.

### 2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą normy PN-Z-04008-7: 2002/Az1:2004). Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

### 3. Zasada metody

Zasada metody polega na zatrzymaniu obecnego w powietrzu cyklofosfamidu na filtrze z włókna szklanego, wymyciu zatrzymanego związku za pomocą mieszaniny metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego 0,1-procentowego za pomocą mieszadła rolkowego, a następnie poddaniu ilościowemu oznaczeniu przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas.

### 4. Wytyczne ogólne

#### 4.1. Czystość odczynników

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

#### 4.2. Dokładność ważenia

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

#### 4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji chemicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym. Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich unieszkodliwianiem.

### 5. Odczynniki

#### 5.1. Cyklofosfamid

Stosować według punktu 4.

#### 5.2. Kwas mrówkowy

Stosować według punktu 4.

#### 5.3. Metanol

Stosować metanol o czystości do LC - MS.

#### 5.4. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

### 6. Roztwory

#### 6.1. Roztwór ekstrakcyjny

Sporządzić mieszaninę ekstrakcyjną przez zmieszanie metanolu i wody w stosunku 1: 1 i dodanie takiej ilości kwasu mrówkowego, aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło 0,1%.

#### 6.2. Roztwór wzorcowy podstawowy cyklofosfamidu

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć na wadze analitycznej (wg punktu 7.11.) około 10 mg wzorca cyklofosfamidu (wg punktu 5.1.). Wzorec rozpuścić w mieszaninie ekstrakcyjnej (wg punktu 6.1.), a po rozpuszczeniu się wzorca, kolbę uzupełnić do kreski i obliczyć zawartość związku w jednym mililitrze roztworu.

#### 6.3. Roztwór wzorcowy pośredni cyklofosfamidu

Do kolby miarowej o pojemności 5,0 ml odmierzyć pipetą (wg punktu 7.6.) taką ilość wzorca podstawowego cyklofosfamidu, aby końcowe stężenie wynosiło 100 µg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski mieszaniną ekstrakcyjną (wg punktu 6.1.).

#### 6.4. Roztwory wzorcowe robocze

Do siedmiu kolb miarowych o pojemności 5 ml odmierzyć pipetami (wg punktów: 7.4., 7.8. i 7.9.)

odpowiednio: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 i 5 ml roztworu pośredniego wg punktu 6.3. Kolby uzupełnić do kreski roztworem ekstrakcyjnym wg punktu 6.1. Stężenia cyklofosfamidu w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 2; 5; 10; 20; 50 i 100 µg/ml.

## 7. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

### 7.1. Chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas

Stosować chromatograf cieczowy wyposażony w tandemowy spektrometr mas umożliwiający pracę w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych.

### 7.2. Filtry szklane

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm i średnicy porów 1,6 µm.

### 7.3. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry z membraną z PTFE.

### 7.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności 5 i 10 ml.

### 7.5. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę analityczną wypełnioną fazą oktadecylową o średnicy ziaren 5 µm, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm.

### 7.6. Mieszadło rolkowe

Stosować mieszadło rolkowe.

### 7.7. Naczynka szklane (wiale)

Stosować wiale o pojemności 2 i 4 ml.

### 7.8. Pipety automatyczne nastawne

Stosować pipety automatyczne nastawne o pojemności 0,010 ÷ 0,1 ml i 0,1 ÷ 1 ml.

### 7.9. Pipety szklane

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

### 7.10. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości około 15 l/h.

### 7.11. Waga analityczna

Stosować wagę analityczną umożliwiającą ważenie z dokładnością do 0,0002 g.

## 8. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-7: 2002 (wraz z późniejszą zmianą normy PN-Z-04008-7: 2002 /Az1: 2004). Filtry wg punktu 7.2. umieścić w oprawkach i za pomocą pompy (wg punktu 7.10). przepuścić przez nie około 50 l powietrza ze stałym strumieniem objętości. Filtry z pobranymi próbkami powietrza umieścić w hermetycznych pojemnikach i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwale nie dłużej niż 18 dni.

## 9. Warunki pracy chromatografu cieczowego

Warunki pracy zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemowym spektrometrem mas umożliwiające selektywne oznaczenie cyklofosfamidu w obecności innych związków podano w tabeli 1.

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

**Tabela 1.**  
Przykładowe warunki pracy chromatografu cieczowego

Kolumna analityczna Supelcosil LC-18- 150 x 3 mm x 3 µm	
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w metanolu (A) ÷ 0,1-procentowy kwas mrówkowy w wodzie (B) 6 ÷ 4 (A : B)
Warunki pracy spektrometru	jonizacja ES +
Fragmentacja jonów: tryb MRM	napięcie kapilary 3,0 kV
( <i>multiple reaction monitoring</i> )	napięcie źródła jonów 27 V
cyklofosfamid: 261→140	napięcie ekstraktora 2 V
	napięcie soczewek RF 0,1 V
	temperatura źródła jonów 110 °C
	temperatura desolwacji 350 °C
	przepływ azotu w źródle jonów 1 l/h
	przepływ azotu desolwacji 600 l/h

cd. tab. 1.

Kolumna analityczna Supelcosil LC-18- 150 x 3 mm x 3 µm		
	rozdzielczość LM/HM 1	13/12
	energia jonów 1	1,0
	komora kolizyjna:	
	– energia wejścia	1
	– energia kolizji	22
	– energia wyjścia	1
	rozkład LM/HM 2	13/12
	energia jonów 2	1,0
	ciśnienie gazu kolizyjnego	3,5 x 10 <sup>-3</sup> mbar
Strumień objętości fazy ruchomej		0,3 ml/min
Temperatura kolumny		40 °C
Objętość próbki		10 µl

### 10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na siedem filtrów (wg punktu 7.2.) nanieść za pomocą pipety automatycznej (wg punktu 7.8.) po 10 µl roztworów wzorcowych roboczych (wg punktu 6.4.) Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml (wg punktu 7.7.). Do każdej wiali dodać po 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 6.1.) i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu mieszadła rolkowego (wg punktu 7.6.). Masa cyklofosfamidu naniesiona na filtry wynosi odpowiednio: 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 µg. Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml (wg punktu 7.7.), przepuszczając je przez filtry strzykawkowe (wg punktu 7.3.) i poddać zawartość analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych masę wzorca naniesionego na filtr, a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni (wysokości) pików danego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

### 11. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 7.6. Do

wial dodać po 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 6.1.) i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu mieszadła rolkowego (wg punktu 7.6.). Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe (wg punktu 7.3.), następnie wiale szczelnie zamknąć i zawartość poddać analizie chromatograficznej. W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtórne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie uwzględnić w obliczeniach.

### 12. Obliczanie wyniku oznaczania

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

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

w którym:

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