

5-Fluorouracyl – frakcja wdychalna

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

5-Fluorouracil – inhale fraction

Determination method in workplace air

mgr MARZENA BONCZAROWSKA

<https://orcid.org/0000-0003-3612-0656>

dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

<https://orcid.org/0000-0002-0542-8538>

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera

Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź

Numer CAS

51-21-8

Streszczenie

5-Fluorouracyl (5-FU) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białego lub bezwonnego proszku. 5-FU jest jednym z najczęściej stosowanych cytostatyków, wykazującym silne działanie w przypadkach nowotworów układu pokarmowego, a zwłaszcza w przypadku raka jelita grubego. Zawodowe narażenie na 5-FU (przez skórę lub drogą inhalacyjną) dotyczy głównie pracowników służby zdrowia oraz osób zatrudnionych przy produkcji tego leku. Narażenie na 5-FU tymi drogami może skutkować uszkodzeniem szpiku kostnego, negatywnym wpływem na układ sercowo-naczyniowy oraz w przypadku kontaktu ze skórą podrażnieniami skóry i reakcjami alergicznymi.

Celem prac badawczych było opracowanie i walidacja metody oznaczania stężeń 5-fluorouracylu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie $1/10 \div 2$ zaproponowanej wartości NDS, zgodnie z wymaganiami normy europejskiej PN-EN 482.

Do badań wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Rozdziałów chromatograficznych dokonywano przy użyciu kolumny analitycznej XTerra C-18 o wymiarach $150 \times 2,1$ mm, o uziarnieniu $3,5 \mu\text{m}$, którą wymywano mieszaniną acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego.

Metoda polega na zatrzymaniu obecnego w powietrzu fluorouracylu na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny acetonitryl: woda z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu. Zaproponowany sposób ekstrakcji 5-FU z filtrów umożliwia wysoki odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku wynosi 0,93. Zależność wskazań detektora UV-VIS w funkcji stężeń 5-FU ma charakter liniowy ($r = 0,999$) w zakresie stężeń $0,052 \div 2,6 \mu\text{g/ml}$. Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego wynoszą odpowiednio $0,007$ i $0,022 \mu\text{g/ml}$.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach IV etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/ Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Zastosowanie w oznaczeniach detektora UV-VIS oraz kolumny XTerra pozwala na selektywne i specyficzne oznaczenie 5-FU w obecności innych leków cytostaticznych. Metoda zapewnia możliwość oznaczenia 5-FU na poziomie 0,00014 mg/m³, tj. na poziomie 1/25 obowiązującej wartości NDS. Opisana w załączniku w formie przepisu analitycznego metoda spełnia wymagania normy PN-EN 482 stawiane procedurom oznaczania czynników chemicznych. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: fluorouracyl, cytostatyki, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

5-Fluorouracil (5-FU) at room temperature is a fine white crystalline odorless powder. 5-FU is one of the most widely used cytotoxic drug and has a strong antitumor activity in gastrointestinal tract cancer, especially of colorectal cancer. Occupational exposure to 5-fluorouracil (mainly via skin contact or via inhalation route) may occur among group of healthcare workers or workers employed in the production of this drug. Exposure to 5-FU can cause suppression of bone marrow function, cardiotoxicity and in the case of skin contact, skin irritation or allergic skin reactions. The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for determining the concentration of 5-fluorouracil in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of standard PN-EN 482. The study was performed using a liquid chromatograph with spectrophotometric detection (HPLC-UV-VIS). All chromatographic analysis were performed with XTerra C-18 150 × 2.1 mm × 3.5 mm analytical column, which was eluted with mixture of acetonitrile and water with 0.1% of formic acid. This method is based on the collection of 5-FU on glass fiber filter, extraction with mixture of acetonitrile:water with addition of formic acid (0.1%), and chromatographic determination of resulted solution with HPLC-UV-VIS. The average recovery factor of 5-FU from filters was 0.93. The method is linear ($r = 0.999$) within the investigated working range of 0.052–2,6 µg/ml. The calculated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.007 and 0.022 µg/ml, respectively. The analytical method described in this paper, thanks to the UV-VIS detection technique and Xterra analytical column, makes it possible to selectively determine 5-FU in workplace air in the presence of other compounds at concentrations from 0.00014 mg/m³ (1/25 MAC value). The method is precise, accurate and it meets the criteria for procedures for measuring chemical agents listed in standard EN 482. This method can be used for assessing occupational exposure to 5-FU and associated risk to workers' health. The developed method of determining 5-FU has been recorded as an analytical procedure (see appendix). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

Keywords: fluorouracil, cytostatics, analytical method, liquid chromatography, workplace air, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

5-Fluorouracyl (5-FU) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białego, bezwonnego proszku. Jest substancją dość trudno rozpuszczalną w wodzie (12,5 g/l w temp. 20 °C). Lepiej rozpuszcza się w metanolu (18 g/l) oraz mieszaninach wody i metanolu. 5-FU dobrze rozpuszcza się w wodnych roztworach zasad (50 g/l w 1 N NH₄OH), a jego rozpuszczalność zwiększa się wraz ze wzrostem pH roztworu. Jest związkiem praktycznie nierozpuszczalnym w takich rozpuszczalnikach organicznych jak chloroform, benzen i eter.

5-FU jest otrzymywany w wyniku reakcji fluoru z uracylem (1H-pirymidyno-2,4-dion). Związek ten należy do grupy tzw. antymetabolitów i jest wy-

korzystywany jako lek w terapii przeciwnowotworowej w przypadku raka jelita, pęcherza, prostaty, jajników, szyjki macicy, przelyku oraz wątroby i skóry (rak podstawnokomórkowy). Szkodliwe działanie 5-FU polega na uszkodzaniu szpiku kostnego i wywoływaniu dolegliwości układu pokarmowego (nudności, wymioty, krwotoki, biegunka), sercowo-naczyniowego i nerwowego. Stosowanie 5-FU w formie kremów powodowało również wystąpienie zmian na skórze (zacerwienie, podrażnienie, swędzenie, wysypka). Zawodowe narażenie na 5-FU może skutkować uszkodzeniem szpiku kostnego, negatywnym wpływem na układ sercowo-naczyniowy oraz podrażnieniami skóry

i błon śluzowych oczu i górnych dróg oddechowych (HSDB 2007; Kupczewska-Dobecka 2019). 5-FU został zaliczony przez International Agency for Research on Cancer (IARC) do grupy 3., to jest do grupy związków nie klasyfikowanych jako czynniki rakotwórcze dla ludzi (IARC 1987).

W warunkach ekspozycji zawodowej 5-FU może dostawać się do organizmu osób narażonych głównie drogą inhalacyjną oraz przez skórę (Fransman i in. 2007; Sessink i in. 1994). Zawodowe narażenie na ten związek dotyczy przede wszystkim pracowników służby zdrowia (farmaceuci, pielęgniarzy, lekarze, salowe), osób świadczących usługi dla służby zdrowia, np. pracowników pralni bądź firm przetwarzających odpady, jak również pracowników produkcyjnych zakładów farmaceutycznych. 5-FU jest jednym z leków najczęściej stosowanych w terapii przeciwnowotworowej i z tego względu liczba osób potencjalnie narażonych na ten związek w Polsce może sięgać kilku tysięcy. 5-Fluorouracyl nie jest klasyfikowany urzędowo w Unii Europej-

skiej i nie ma klasyfikacji zharmonizowanej (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie WE nr 1907/2006 ze zm. rozporządzeniem Komisji (WE) nr 790/2009).

W tabeli 1. przedstawiono klasyfikację producentów leku zamieszczoną w zgłoszeniu rejestracyjnym do Europejskiej Agencji Chemikaliów (ECHA 2017).

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 r. zmieniającym rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (DzU 2020, poz. 61) wartość NDS dla 5-FU wynosi 0,0035 g/m³.

Tabela 1.

Klasyfikacja i oznakowanie 5-fluorouracylu (5-FU) w zgłoszeniu rejestracyjnym do ECHA

Klasyfikacja zagrożenia i kody kategorii	Kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
Acute Tox. 3 Toksyczność ostra (kat. 3)	H 301 – działa toksycznie po połyknięciu
Acute Tox. 4 Toksyczność ostra (kat. 4)	H312 – działa szkodliwie w kontakcie ze skórą
Skin Irrit. 2 Działanie drażniące na skórę (kat. 2)	H315 – działa drażniąco na skórę
Eye Irrit. 2 Działanie drażniące na oczy (kat. 2)	H319 – działa drażniąco na oczy
STOT 3 SE Działanie toksyczne na narządy docelowe, narażenie jednorazowe (kat. 3)	H335 – może powodować podrażnienie dróg oddechowych
Muta. 1B Działanie mutagenne na komórki rozrodcze po podaniu drogą dożołądkową (kat. 1B)	H 340 – może powodować wady genetyczne po podaniu drogą dożołądkową
Repr. 1B Działanie szkodliwe na rozrodczość (kat. 1B)	H 360 – może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki po podaniu drogą dożołądkową

Cel pracy

Celem prac badawczych było przedstawienie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania 5-FU w powietrzu na stanowiskach pracy, umożli-

wiającej pomiary jego stężeń, a następnie dokonanie oceny narażenia zawodowego.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura, materiały i odczynniki

Wszystkie badania wykonano z zastosowaniem materiałów i odczynników wymienionych poniżej.

Materiały i odczynniki

W badaniach zastosowano:

- filtry z włókna szklanego GF/A 25 mm (Whatman),
- filtry strzykawkowe z membraną z PTFE (Supelco),
- kolby miarowe 2 i 10 ml,
- naczynka (wialki) szklane o pojemności 2 i 4 ml ze szkła oranżowego,
- pipety automatyczne nastawne o pojemności 0,010 ÷ 0,1 ml i 0,1 ÷ 1 ml,
- 5-fluorouracyl (Sigma-Aldrich),
- kwas mrówkowy (POCH),

- acetonitryl do HPLC (JT Baker),
- woda do HPLC (Hydrolab R-10).

Do badań wykorzystano chromatograf cieczowy firmy Waters model „Alliance 2695 LC System” wyposażony w poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, automatyczny dozownik próbek, termostat kolumny analitycznej i komputer z programem sterowania i akwizycji danych (Empower). Analizy chromatograficzne wykonywano z zastosowaniem kolumny analitycznej XTerra C-18 150 × 2,1 mm, 3,5 μm, wypełnionej fazą oktadecylową (C-18). Do detekcji wykorzystano detektor UV-VIS Waters 2996. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory indywidualne GilAir 3. Substancje wzorcowe odważano wagą analityczną Sartorius Research, a do ekstrakcji próbek stosowano wytrząsarkę mechaniczną.

WYNIKI BADAŃ

Warunki oznaczania chromatograficznego

Z danych literaturowych wynika, że do oznaczania 5-fluorouracylu (5-FU) w powietrzu stosowane są techniki chromatograficzne takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV), (Castiglia i in. 2008; Larson i in. 2003; Ahmad i in. 2011), wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas (HPLC/MS/MS), (Colombo i in. 2017; da Silva i in. 2016; Koller i in. 2018) oraz chromatografia gazowa z detekcją mas (GC/MS), (Kosjek i in. 2013; Tauxe-Wuersch i in. 2006). Zastosowanie GC/MS wymaga przed analizą instrumentalną poddania 5-FU reakcji silylacji z *N*-tert-butylo-dimetylosililo-*N*-metylo-trifluoroacetamidem (MTBSTFA) celem uzyskania stabilnej termicznie i zapewniającej uzyskanie intensywnych sygnałów pochodnej (Kosjek i in. 2013). Obie metody oparte na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej umożliwiają oznaczenie stężeń 5-FU w wymaganym zakresie 1/10 ÷ 2 wartości proponowanego NDS bez ko-

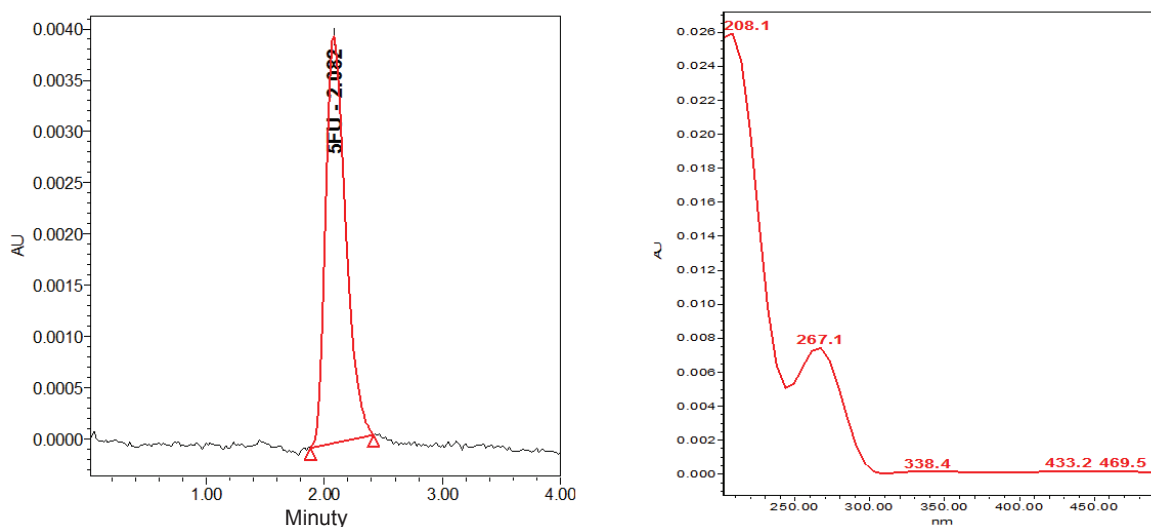
nieczności stosowania dodatkowych etapów przygotowania próbki przed końcową analizą instrumentalną. Z uwagi na większą dostępność techniki HPLC-UV-VIS i wcześniejsze doświadczenia autorów w tym zakresie (dane niepublikowane) zdecydowano o wykorzystaniu tej metody do opracowania procedury analitycznej oznaczania 5-FU w powietrzu na stanowiskach pracy. Zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu 1/10 ÷ 2 wartości obowiązującego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS).

Optymalne warunki pracy zestawu LC-UV-VIS stosowanego podczas opracowywania metody podano w tabeli 2. Optymalną długość fali analitycznej dla oznaczeń 5-FU dobrano na podstawie analizy widma UV tego związku w zakresie 200 ÷ 400 nm (rys. 1.). Zastosowanie w analizach kolumny XTerra 150 × 2,1 mm wypełnionej złożem typu C-18 o średnicy ziaren 3,5 μm i parametrów pracy zestawu chromatograficznego podanych w tabeli 2. pozwala

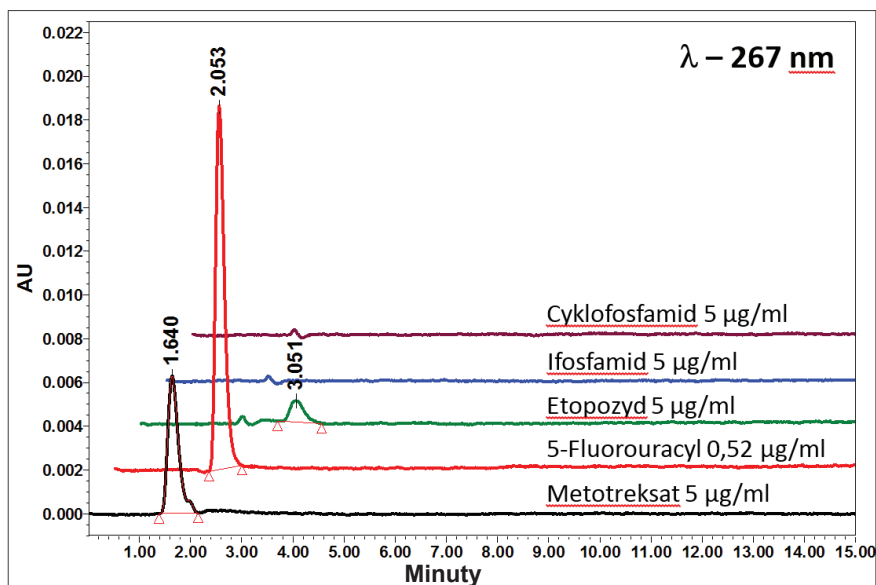
na selektywne oznaczenie 5-FU w obecności innych cytostatyków. Na rysunku 2. przedstawiono chromatogramy pięciu związków (metotreksat, 5-fluorouracyl, etopozyd, cyklofosfamid, ifosfamid) zarejestrowane przy długości fali 267 nm na detektorze UV-VIS z zastosowaniem kolumny XTerra i podanych w tabeli 2. warunków rozdzielania chromatograficznego.

Z analizy tych danych wynika, że obecność innych cytostatyków, nawet w wysokich stężeniach (5 µg/ml), nie przeszkadza w oznaczeniach 5-FU,

gdyż przyjęte warunki rozdzielania chromatograficznego zapewniają możliwość selektywnego oznaczenia 5-FU, a ponadto inne związki z tej grupy leków nie wykazują wysokiej absorpcji przy długości fali 267 nm (MTX, EP) lub tak jak CP i IF nie wykazują jej wcale. Cyklofosfamid i ifosfamid wykazują maksimum absorpcji przy długości fali 195 nm (Kossonou i in. 2019), a metotreksat i etopozyd odpowiednio 302 nm i 285 nm (Ciekot i in. 2012; Sousa i in. 2013).



Rys. 1. Chromatogram (A) i widmo UV 5-fluorouracylu (B) w zakresie 200 ÷ 400 nm



Rys. 2. Chromatogramy metotreksatu, 5-fluorouracylu, etopozydu, ifosfamidu i cyklofosfamidu zarejestrowane przy długości fali 267 nm

Tabela 2.

Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS

Kolumna analityczna	XTerraTM LC-18- 150 × 2,1mm × 3,5 μm
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w ACN: 0,1-procentowy kwas mrówkowy w H ₂ O 6: 4
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,2 ml/min
Temperatura kolumny	40 °C
Objętość próbki	10 μl
Długość fali analitycznej	267 nm

Pobieranie i przygotowanie próbek powietrza do analizy

Zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu 1/10 ÷ 2 wartości obowiązującego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS).

Próbki powietrza do oznaczania 5-FU zgodnie z zasadami podanymi w PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 należy pobierać za pomocą aspiratorów indywidualnych, umożliwiających pobieranie powietrza ze strumieniem objętości 2 l/min i wyposażonych w głowice do pobierania frakcji wdychalnej.

Z uwagi na własności fizyko-chemiczne 5-FU może występować w powietrzu głównie w postaci krystalicznej bądź aerozolu. Z tego względu do pobierania próbek powietrza do oceny narażenia zawodowego wykorzystuje się filtry z włókna szklanego (Mason i in. 2005; Pretty i in. 2012).

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla 5-fluorouracylu we frakcji wdychalnej pyłu lub aerozolu wynosi 0,0035 mg/m³.

Na podstawie wcześniejszych prac doświadczalnych dotyczących metod oznaczania innych cytostatyków (metotreksat, dokсорubicyna, docetaksel, etopozyd), (Bonczarowska i in. 2018; Brzeźnicki 2015; Szewczyńska 2018a; 2018b) zdecydowano o wykorzystaniu do pobierania próbek filtrów z włókna szklanego o średnicy 25 mm,

umieszczonych w głowicach do pobierania frakcji wdychalnej.

Celem zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na retencję 5-FU na filtrach z włókna szklanego przygotowano 3 serie po 6 filtrów, na które naniesiono po 10 μl roztworów wzorcowych 5-FU o stężeniach 26; 104 i 520 μg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w głowicach do pobierania próbek powietrza. Przez filtry przepuszczono powietrze ze strumieniem objętości 2 l/min przez 360 min, stosując do tego celu aspiratory indywidualne. Po tym czasie filtry przenoszono do wial o pojemności 4 ml, dodawano po 2 ml mieszaniny acetonitryl: woda (1: 1; v: v) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i ekstrahowano przez 30 min przy użyciu wytrząsarki mechanicznej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,45 μm, a następnie poddano analizie chromatograficznej. W celu sprawdzenia strat analitu podczas pobierania próbek powietrza wielkości pól powierzchni pików uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów, na które naniesiono takie same stężenia 5-FU, ale nie przepuszczano przez nie powietrza.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 3. Analiza tych danych wskazuje, że przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje istotnych ilościowych strat 5-fluorouracylu zatrzymanego na filtrach z włókna szklanego. Średnie wartości współczynników odzysku 5-FU z filtrów, przez które nie przepuszczano powietrza, dla stężeń 0,013; 0,52 i 2,6 μg/ml wynoszą odpowiednio 0,93 (SD – 0,027); 0,92 (SD – 0,023) i 0,94 (SD – 0,042).

Tabela 3.

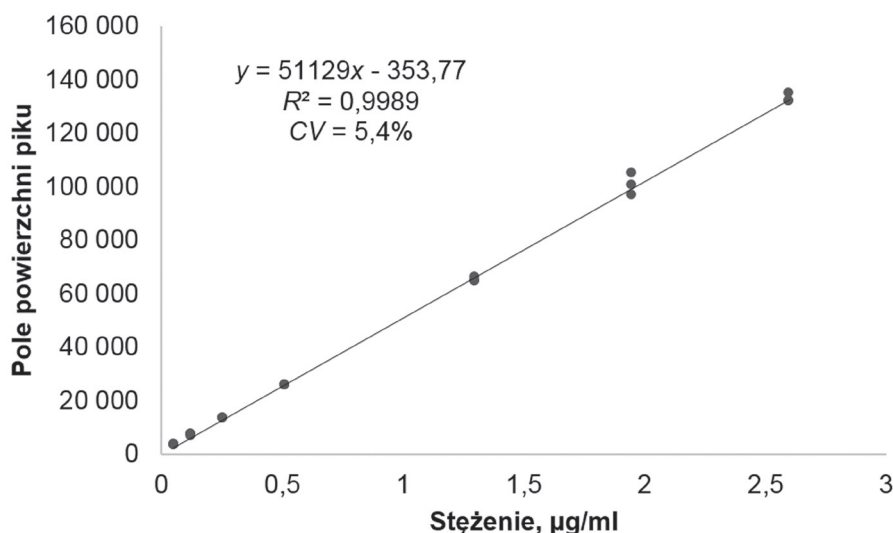
Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń 5-fluorouracylu (5-FU)

Medium pochłaniające	Zawartość 5-FU na filtrze, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku	Średnia wartość współczynnika odzysku
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,26	5 751,73 5 693,38 5 859,84	5 505,63 5 266,34 5 622,56 5 204,26 5 310,75 5 383,22	0,95 0,91 0,97 0,90 0,92 0,93 SD 0,03 CV 2,9	0,93
	1,04	21 125,40 23 094,87 21 710,83	19 304,89 20 383,55 20 311,79 20 755,13 20 355,41 20 600,69	0,88 0,93 0,92 0,94 0,93 0,94 SD 0,2 CV 2,5	0,92
	5,2	114 526,08 111 791,98 113 911,80	101 335,70 107 814,95 110 413,69 114 112,82 102 971,60 104 849,82	0,89 0,95 0,97 1,0 0,91 0,93 SD 0,04 CV 4,5	0,94
Średni współczynnik odzysku, \bar{r} , %		0,93			
Odchylenie standardowe, SD		0,03			
Współczynnik zmienności, CV , %		3,5			

Badanie zakresu stosowania i precyzji metody analitycznej

Celem określenia zakresu roboczego metody przygotowano 3 serie po 8 filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych o stężeniach 0; 10,4; 26; 52; 104; 260; 390 i 520 µg/ml, co odpowiada zawartości 0; 0,104; 0,26; 0,52; 1,04; 2,6; 3,9 i 5,2 µg 5-FU na filtrze. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w wialach o pojemności 4 ml, zalano 2 ml mieszaniny acetonitryl: woda (1: 1; v: v) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego, a następnie poddano ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej przez 30 min.

Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej. Wyniki badania liniowości metody przedstawiono graficznie na rysunku 3. Zależność odpowiedzi detektora UV-VIS od stężenia 5-FU ma charakter liniowy w zakresie 0,052 ÷ 2,6 µg/ml (0,00014 ÷ 0,0072 mg/m³ dla próbki powietrza 720 l). Zależność tę opisuje równanie $y = 51129x - 353,8$. Wyrażony w procentach błąd względny CV wynosi 5,4%, a współczynnik korelacji „ r ” – 0,9994.



Rys. 3. Krzywa wzorcową 5-fluorouracylu (5-FU) na filtrach z włókna szklanego

Celem zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano 3 serie po 10 filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych 5-FU o stężeniach 26; 104 i 520 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenoszono do naczynek o pojemności 4 ml, dodawano po 2 ml mieszaniny acetonitryl: woda (1: 1; v: v) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego i ekstrahowano przez 30 min z użyciem wytrząsarki mechanicz-

nej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania precyzji metody przedstawiono w tabeli 4. Współczynniki zmienności (CV) rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń 0,13; 0,52 i 2,6 µg/ml wynoszą odpowiednio: 4,7; 3,7 i 1,6%.

Tabela 4.

Wyniki badania precyzji metody oznaczania 5-fluorouracylu (5-FU)

Numer analizy	Stężenie, µg/ml		
	0,13	0,52	2,6
1	7 580,5	31 670,4	197 199,0
2	8 397,0	34 089,0	195 553,5
3	7 764,5	35 704,0	196 136,0
4	8 548,0	34 826,5	198 064,0
5	7 721,0	36 070,0	200 265,0
6	8 058,0	34 016,5	194 517,5
7	8 120,0	35 422,5	198 624,0
8	7 689,0	33 668,5	188 877,0
9	8 659,0	35 110,5	197 655,0
10	8 170,0	33 994,0	193 452,5
Średnia	8 070,70	34 457,19	196 034,35
SD	379,31	1 272,94	3 217,02
CV, %	4,7	3,7	1,6

Badanie warunków przechowywania pobranych próbek

Do zbadania trwałości (5-fluorouracylu) 5-FU pobranego na filtry z włókna szklanego przygotowano

4 serie po 6 filtrów, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych o stężeniach 26; 104 i 520 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczano w hermetycznych pojemnikach i przechowywano w chłodziarce przez okres 5, 10, 15 i 30 dni. W dniu

badania filtry ekstrahowano 2 ml mieszaniny acetonitryl: woda (1: 1; v: v) z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego przez 30 min z użyciem wyrząsarki mechanicznej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej. Uzyskane wartości pól powierzchni pików 5-FU porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów przygotowanych w dniu badania.

Wyniki badań warunków przechowywania próbek przedstawiono w tabeli 5. Zebrane dane

wskazują, iż próbki 5-fluorouracylu pobrane na filtry i umieszczone w hermetycznych pojemnikach przechowywanych w chłodziarce są trwałe 10 dni. Po tym okresie przechowywania próbek wyrażone w procentach współczynniki odzysku 5-FU z filtrów dla zawartości 0,26; 1,04 i 5,2 µg/filtr wynosiły odpowiednio 100,1; 95,3 i 100,4% (śr. 98,4%; SD – 3,1).

Dłuższe przechowywanie próbek 5-FU pobranych na filtr z włókna szklanego powoduje blisko 10 % straty analitu w próbkach o stężeniach w zakresie $\frac{1}{2} \div 2$ wartości NDS.

Tabela 5.

Wpływ czasu przechowywania na trwałość 5-fluorouracylu (5-FU) pobranego na filtr

Czas, liczba dni	Zawartość 5-FU na filtrze								
	0,26 [% odzysku]			1,04 [% odzysku]			5,2 [% odzysku]		
5	97,7	111,2	95,5	96,1	99,0	97,5	89,7	103,6	89,5
	111,7	102,3	97,0	97,3	95,4	98,3	103,0	106,8	89,4
	Śr	102,6%		Śr	97,2%		Śr	98,5%	
	SD	7,2		SD	1,3		SD	8,3	
	CV	7,1%		CV	1,4%		CV	8,4%	
	Średni współczynnik odzysku,			Śr	99,4%				
	Odchylenie standardowe,			SD	6,4				
	Współczynnik zmienności,			CV	6,5%				
10	100,8%	100,5%	102,2%	95,7%	96,4%	92,8%	100,7%	97,3%	103,8%
	97,6%	99,3%	100,6%	97,0%	94,6%	93,9%	97,7%	102,6%	97,0%
	Śr	100,1%		Śr	95,3%		Śr	100,4%	
	SD	1,7		SD	1,7		SD	2,9	
	CV	1,7%		CV	1,7%		CV	2,9%	
	Średni współczynnik odzysku,			Śr	92,2%				
	Odchylenie standardowe,			SD	7,8				
	Współczynnik zmienności,			CV	8,6%				
15	92,5%	93,8%	96,8%	92,3%	87,7%	88,4%	87,1%	88,9%	90,5%
	99,6%	97,7%	100,4%	92%	98,2%	90,9%	83,8%	87,2%	90,7%
	Śr	96,1%		Śr	91,7%		Śr	87,5%	
	SD	2,9		SD	4,2		SD	2,5	
	CV	3,0%		CV	4,6%		CV	2,8%	
	Średni współczynnik odzysku,			Śr	92,1%				
	Odchylenie standardowe,			SD	4,8				
	Współczynnik zmienności,			CV	5,2%				
30	103,5%	96,5%	95,9%	86,5%	88,9%	93,2%	92,8%	89,1%	89,1%
	99,8%	92,4%	92,1%	93,0%	94,4%	95,8%	91,7%	89,7%	91,1%
	Śr	97,6%		Śr	91,2%		Śr	90,5%	
	SD	4,2		SD	3,3		SD	1,7	
	CV	4,3%		CV	3,7%		CV	1,9%	
	Średni współczynnik odzysku,			Śr	92,8%				
	Odchylenie standardowe,			SD	4,2				
	Współczynnik zmienności,			CV	4,5%				

WALIDACJA METODY

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,00014 ÷ 0,0072 mg/m³ (dla próbki powietrza 720 l)
- granica oznaczalności, X_{ozn} 0,0022 µg/ml

- granica wykrywalności, X_{gw} 0,0007 µg/ml
- współczynniki korelacji charakteryzujące liniowość krzywych wzorcowych $r = 0,9989$
- niepewność całkowita metody 11,8%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano metodę oznaczania 5-fluorouracylu w powietrzu środowiska pracy z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Zastosowanie kolumny analitycznej XTerra C-18 o wymiarach 150 × 2,1 mm, 3,5 µm, eluowanej mieszaniną acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego,

pozwała na oznaczenie tego związku w obecności innych cytostatyków. Opisana metoda umożliwiła oznaczenie stężeń 5-fluorouracylu w powietrzu środowiska pracy w zakresie 0,00014 ÷ 0,0072 mg/m³, tj. ~ 1/25 ÷ 2 wartości NDS. Metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami normy PN-EN-482+A1:2016-01 i opisana w formie procedury analitycznej zamieszczonej w załączniku.

PIŚMIENNICTWO

Ahmad M., Usman M., Madni A. 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.

Bonczarowska M., Mikołajewska K., Brzeźnicki S. (2018). Etopozyd – frakcja wdychalna. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]*. 2(96), 161–173.

Brzeźnicki S., Bonczarowska M., Mikołajewska K.: (2015). Metotrexat. Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]*. 1(87), 93–108.

Castiglia L., Miraglia N., Pieri M. in. (2008). Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. *J Occup Health.* 50(1), 48–56.

Ciekot J., Goszczyński T., Boratyński J. (2012). Methods for methotrexate determination in macromolecular conjugates drug carrier. *Acta Pol Pharm.* 69(6), 1342–1346.

Colombo M., Jeronimo M., Astrakianakis G., Apte C., Hon C.-Y. (2017). Wipe sampling method and evaluation of environmental variables for assessing surface contamination of 10 antineoplastic drugs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Ann. Work Expo. Health.* 61(8), 1003–1014.

ECHA (2019). Fluorouracil [<https://echa.europa.eu/pl/substance-information/-/substanceinfo/100.000.078>].

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(5), 396–403.

HSDB (2007). Fluorouracil [<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~gWrZce:1>].

IARC (1987). IARC monographs on the evaluation of the evidence for carcinogenic risks to HUMANS IARC monographs vol. 1–42. IARC Monographs Supplement 7. Fluorouracil [<http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/fluorouracil5.html>].

- Koller M., Böhlandt A., Haberl C., Nowak D., Schierl R. (2018). Environmental and biological monitoring on an oncology ward during a complete working week. *Toxicol. Lett.* 298, 158–163.
- Kosjek T., Perko S., Žigon D., Heath E. (2013). Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. *J. Chromatogr. A.* 17, 1290, 62–72.
- Kossonou Roland N., Soro Donafologo B., Aboua Kouassi N., Gombert B., Meite L., Dembele A., Mamadou K., Karim Sory T. (2019). Uva/TiO₂ system for decontamination of polluted waters by cancer drugs: ifosfamide and cyclophosphamide. *Int. J. Adv. Res.* 7(9), 554–564.
- Kupczewska-Dobecka M. (2019). Fluorouracyl – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]. 2(100), 49–81.
- 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), 109–119.
- Mason H.J., Blair S., Sams C. i in. (2005). Exposure to anti-neoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. *Ann. Occup. Hyg.* 49(7), 603–610.
- PN-EN 482+A1:2016 Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych [Polish standard].
- PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników [Polish standard].
- Pretty J.R., Connor T.H., Spasojevic I. i in. (2012). Sampling and mass spectrometric analytical methods for five anti-neoplastic drugs in the healthcare environment. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 18(1), 23–36.
- Sessink P.J., Van de Kerkhof M.C., Anzion R.B., Noordhoek J., Bos R.P. (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), 165–169.
- 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.
- Szewczyńska M., Pośniak M. (2018a). Chlorowodorek doxorubicyny. Metoda oznaczenia w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]. 2(96), 115–131.
- Szewczyńska M., Pośniak M. (2018b). Docetaksel. Metoda oznaczenia w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [Principles and Methods of Assessing the Working Environment]. 2(96), 145–159.
- Tauxe-Wuersch A., de Alencastro L.F., Grandjean D., Taradellas J. (2006). Trace determination of tamoxifen and 5-fluorouracil in hospital and urban wastewaters. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86(7), 473–485.
- Tavares de Sousa C., Rodrigues da Silva G., Pianetti G.A., Reis Solano G.A. (2013). Spectrophotometric determination of etoposide from polymeric implant and application in the study of in vitro release profile. *Rev. Bras. Farm.* 94(3), 295–301.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA 5-FLUOROURACYLU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń frakcji wdychalnej 5-fluorouracylu (CAS:51-21-8) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS).

Najmniejsze stężenie 5-FU, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,00014 mg/m³.

2. Powołanie normatywne

P-Z-04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą 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 5-fluorouracylu na filtrze z włókna szklanego, wymyciu zatrzymanego związku mieszaniną acetonitryl: woda z dodatkiem kwasu mrówkowego przy użyciu wytrząsarki mechanicznej, a następnie poddaniu ilościowemu oznaczeniu przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym (UV-VIS).

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Do wykonania 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. Użyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich utylizacją.

5. Odczynniki i roztwory

5.1. 5-Fluorouracyl

Stosować 5-fluorouracyl wg punktu 4.1.

5.2. Acetonitryl

Stosować acetonitryl o czystości do HPLC.

5.3. Kwas mrówkowy

Stosować kwas mrówkowy wg punktu 4.1.

5.4. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

5.5. Roztwór do ekstrakcji

Sporządzić mieszaninę ekstrakcyjną przez zmieszanie acetonitrylu wg punktu 5.3. i wody wg punktu 5.4. w stosunku 1: 1 i dodać taką ilość kwasu mrówkowego wg punktu 5.3., aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło 0,1%.

5.6. Roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu

Do kolby miarowej wg punktu 6.4. o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml acetonitrylu wg punktu 5.2. i dodać 1 ml kwasu mrówkowego wg punktu 5.3., kolbę uzupełnić do kreski acetonitrylem. Zawartość kolby wymieszać i odgazować za pomocą ultradźwięków.

5.7. Roztwór kwasu mrówkowego w wodzie

Do kolby miarowej wg punktu 6.4. o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml wody wg punktu 5.4. i dodać 1 ml kwasu mrówkowego wg punktu 5.3., kolbę uzupełnić wodą do kreski. Zawartość kolby wymieszać i odgazować za pomocą ultradźwięków.

5.8. Roztwór wzorcowy podstawowy 5-fluorouracylu

Do kolby miarowej wg punktu 6.4. o pojemności 5 ml odważyć na wadze analitycznej wg punktu 6.10. ok. 5 mg wzorca 5-fluorouracylu wg punktu

5.1. Wzorec rozpuścić w roztworze do ekstrakcji wg punktu 5.5. po rozpuszczeniu wzorca kolbę uzupełnić do kreski. Obliczyć zawartość 5-fluorouracylu w 1 ml roztworu.

5.9. Roztwór wzorcowy pośredni 5-fluorouracylu

Do kolby miarowej wg punktu 6.4. o pojemności 5 ml odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.7. taką ilość wzorca podstawowego wg punktu 5.8., aby otrzymać stężenie 520 µg/ml.

5.10. Roztwory wzorcowe robocze 5-fluorouracylu

Do 7 kolb miarowych wg punktu 6.4. o pojemności 1 ml odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.7. odpowiednio 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75 i 1 ml roztworu pośredniego wg punktu 5.9., kolby uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 6.1. Stężenia 5-fluorouracylu w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 10,4; 26; 52; 104; 260; 390 i 520 µg/ml.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającym wykonanie analizy przy długości fali analitycznej $\lambda = 267$ nm.

6.2. Filtry z włókna szklanego

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

6.3. Filtry strzykawkowe

Stosować filtry strzykawkowe o średnicy 13 mm z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 µm.

6.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności 1; 5 i 1000 ml.

6.5. Kolumna chromatograficzna

Stosować chromatograficzną kolumnę analityczną o długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 2,1 mm wypełnioną fazą oktadecylową o średnicy ziaren 3,5 µm.

6.6. Naczynka szklane (wiale)

Stosować naczynka szklane o pojemności 2 i 4 ml.

6.7. Pipety do cieczy

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

6.8. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min.

6.9. Głowice do pobierania próbek powietrza

Stosować głowice do pobierania próbek powietrza frakcji wdychalnej.

6.10 Waga analityczna

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

6.11. Wytrząsarka mechaniczna.

Stosować wytrząsarkę mechaniczną.

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PNZ04008-7:2002 (wraz z późniejszą zmianą PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004).

Za pomocą pompy wg punktu 6.8. przepuścić przez filtr z włókna szklanego wg punktu 6.2. umieszczonego w głowicy do pobierania frakcji wdychalnej wg punktu 6.9. około 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywne oznaczanie 5-fluorouracylu od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.5. oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako warunki przykładowe.

Tabela 1.

Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS

Kolumna analityczna	XTerra™ LC-18- 150 × 2,1 mm × 3,5 μm
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w ACN: 0,1-procentowy kwas mrówkowy w H ₂ O 6: 4
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,2 ml/min
Temperatura kolumny	40 °C
Objętość próbki	10 μl
Długość fali analitycznej	267 nm

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na 8 filtrów wg punktu 6.2. nanieść za pomocą pipety automatycznej wg punktu 6.7. po 10 μl roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 5.10. Masy wzorca 5-fluorouracylu na filtrach wynoszą odpowiednio: 0; 0,104; 0,26; 0,52; 1,04; 2,6; 3,9 i 5,2 μg. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6. Do każdego naczynka dodać po 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.5. i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej wg punktu 6.11. Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.6., przepuszczając je przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.3., i poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość wzorca naniesionego na filtr, a na osi rzędnych wartość pola powierzchni (wysokości) piku danego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6., zalać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.5. i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki mechanicznej wg punktu 6.11. Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.6., przepuszczając je przez filtry strzykawkowe wg punktu 6.3., i 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.

11. Obliczanie wyniku oznaczenia

Stężenia 5-fluorouracylu (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

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

w którym:

- c – zawartość 5-fluorouracylu odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

12. Protokół z badań

W protokole z badań należy podać następujące informacje:

- powołanie na niniejszą normę,
- wszystkie dane konieczne do pełnej identyfikacji próbki,
- wyniki wyrażone w sposób podany w punkcie 11.,
- wszystkie szczegóły niepodane w niniejszej procedurze lub pozostawione do wyboru, a także wszelkie czynniki, które mogły wpłynąć na wyniki.

Adres do korespondencji/Contact details:

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
POLAND

