

Chlorowodorek doksorubicyny

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej¹

Doxorubicin hydrochloride Determination in workplace air with high performance liquid chromatography

dr hab. MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA, prof. nadzw. CIOP-PIB
dr MAŁGORZATA POŚNIAK
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS: 25316-40-9

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

Keywords: doxorubicin hydrochloride, cytostatic drug, analytical method, high performance liquid chromatography, workplace air.

Streszczenie

W artykule przedstawiono metodę oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DXO) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem diodowym (DAD). Metoda polega na: wyodrębnieniu frakcji wdychalnej aerozolu chlorowodoru doksorubicyny z powietrza na filtrze z włókna szklanego, wymyciu analitu wodą destylowaną oraz analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu. Oznaczenia prowadzono w układzie faz odwróconych (faza ruchoma: mieszanina 0,05 mol/L wodorofosforanu disodu i acetonitrylu (65: 35) o pH = 3 z dodatkiem 0,5 mL/L trietyloaminy) z zastosowaniem kolumny

analitycznej C18 wypełnionej modyfikowanym żelom krzemionkowym.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono zakres pomiarowy metody 0,06 ÷ 1,0 µg/m³ dla próbki powietrza 4800 l. Granica wykrywalności (LOD) tej metody wynosi 0,0005 µg/ml, a granica oznaczalności (LOQ) – 0,0015 µg/ml.

Opracowana metoda oznaczania chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

¹ 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 Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej.

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

Summary

This article presents a method for measuring doxorubicin hydrochloride in workplace air with HPLC with diode array detector (DAD). The method is based on adsorption inhalable fraction of doxorubicin hydrochloride aerosol on glass fiber filter, desorption with water, and chromatographic analysis. The analysis was performed in reverse phase (mobile phase – 0.05 mol/L hydrophosphate disodium and acetonitrile (65:35) with

pH – 3 with 0.5 mL/L triethylamine) on C₁₈ column. The measurement range was 0.06 – 1 µg/m³ for 4800-L air sample. The limit of detection (LOD) was 0,0005 µg /ml and the limit of quantification (LOQ) was 0,0015 µg /ml. The developed method of doxorubicin hydrochloride determination has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

WPROWADZENIE

Na podstawie wyników badań (ankietowych) przeprowadzonych w oddziałach onkologicznych i aptekach krajowych szpitali wykazano, że 15% respondentów ma kontakt z chlorowodorkiem doksorubicyny (DXO) podczas pracy (Krzemińska i in. 2016). Jest to organiczny związek chemiczny, antybiotyk z grupy antracyklin o działaniu cytostatycznym. Zakres jego działania i skuteczność należą do wysokich. Przeciwnowotworowe działanie antybiotyków polega na: ich wiązaniu się z DNA, tworzeniu wolnych rodników lub też rozrywaniu i stabilizacji fragmentacji podwójnej spirali DNA, co uniemożliwia transkrypcję kodu DNA na rybosomalny RNA i hamuje syntezę RNA. Działanie związku polega na wejściu z helisą DNA w trwały kompleks, co uniemożliwia dalszy podział i doprowadza do śmierci komórki. Przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) chlorowodorek doksorubicyny został zaklasyfikowany jako substancja prawdopodobnie rakotwórcza dla człowieka – grupa IIA (IARC 1993).

Zgodnie z zasadami rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady tzw. CLP (Rozporządzenie... 2008) chlorowodorek doksorubicyny został zaklasy-

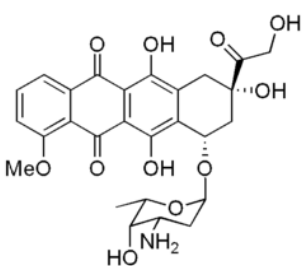
fikowany jako substancja: rakotwórcza kategorii zagrożenia 2., mutagenna kategorii zagrożenia 2. oraz działająca szkodliwie na rozrodczość kategorii zagrożenia 2. (Doxorubicin... 2015) lub wykazująca ostrą toksyczność po połyknięciu (kategoria zagrożenia 4.), działająca drażniąco na skórę i oczy, rakotwórcza kategorii zagrożenia 1.B. Natomiast według kryteriów GHS chlorowodorek doksorubicyny to substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1.B, mutagenna kategorii zagrożenia 1.B i szkodliwie działająca na rozrodczość kategorii zagrożenia 1.B.

Chlorowodorek doksorubicyny, antybiotyk z grupy antracyklin pochodzenia roślinnego, jest stosowany w leczeniu: ostrych białaczek, szpiczaka mnogiego, ziarnicy złośliwej, chłoniaka, raka sutka, drobnokomórkowego raka płuca, raka pęcherza moczowego, jajnika, tarczycy i kory nadnerczy oraz mięsaków.


Podstawowe właściwości fizykochemiczne, toksyczne i farmakologiczne chlorowodoru doksorubicyny podano w tabeli 1.

Tabela 1.

Podstawowe właściwości chlorowodoru doksorubicyny (DXO), (Indeks... 2005)

Właściwości chlorowodoru doksorubicyny


cd. tab. 1.

Właściwości chlorowodoru doksorubicyny	
Nazewnictwo	
ADM, Adriamycin, Adriblastin, Adriblastina, (8S-Cis)-10-Tetrahydro-6,8,11-Trihydroxy-8-(Hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-Naphthacenedione (8S)-10-((4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione Nazwy handlowe: Adriblastin, Biorubina, Caelyx, Myocet, Doxorubicin – Ebewe, Doxolem, Rastocin, Adrimedac	
Informacje ogólne	
Wzór sumaryczny	C ₂₇ H ₃₀ NO ₁₁ CL
Masa molowa	543,52 g/mol
Wygląd	czerwony proszek
Identyfikacja	
Numer CAS	25316-40-9
PubChem	31703
DrugBank	DB00997
Właściwości	
Rozpuszczalność w wodzie	20 g/l
Temperatura topnienia	229 ÷ 231 °C
logP	1,27
Kwasowość (pK _a)	8,33
Niebezpieczeństwa	
Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów	
	
Niebezpieczeństwo. Piktogramy określone w rozporządzeniu mają czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem, na tyle szerokim, aby było wyraźnie widoczne	
Zwroty H	H302 – działa szkodliwie po połknięciu H315 – działa drażniąco na skórę H319 – działa drażniąco na oczy H350 – może powodować raka
Zwroty EUH	brak zwrotów EUH
Zwroty P	P201 – przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności P308+P313 – w razie narażenia lub styczności zasięgnąć porady/ zgłosić się do lekarza
Europejska klasyfikacja substancji	
	

cd. tab. 1.

Właściwości chlorowodoru doksorubicyny	
Toksyczny (T)	
Zwroty H	H340 – może powodować wady genetyczne H350 – może powodować raka H360FD – może działać szkodliwie na płodność. Podejrzenia się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki
Zwroty S	S53 – unikać narażenia, przed użyciem zapoznać się z instrukcją S45 – unikać narażenia, przed użyciem zapoznać się z instrukcją
Dawka śmiertelna	LD ₅₀ 2,4 mg/kg (pies, dożylnie)
Jeżeli nie podano inaczej, dane dotyczą stanu standardowego (25 °C, 1000 hPa)	
Klasyfikacja	
ATC	L01 DB01
Stosowanie w ciąży	kategoria D
Farmakokinetyka	
Działanie	przeciwnowotworowe
Okres półtrwania	12 ÷ 18,5 h
Wiązanie z białkami osocza i tkanek	70%
Metabolizm	wątrobowy
Wydalenie	z kałem
Uwagi terapeutyczne	
Droga podawania	dożylnie

Wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) chlorowodoru doksorubicyny nie jest w Polsce ustalona. Natomiast podawane w kartach charakterystyk tego związku dane o dopuszczalnych limitach narażenia zawodowego wskazują, że wartości te zaproponowane przez ACGIH są na poziomie 0,47 µg/m³ (ustaliła OEL TWA-8 Hr), natomiast zaproponowane przez producenta Pfizer – 0,5 µg/m³.

Metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny opisane w piśmiennictwie dotyczą głównie oznaczania tego związku w materiale biologicznym (we krwi oraz w płazmie i tkankach) i są dedykowane do prowadzenia badań w celu zredukowania negatywnego wpływu tego cytostatyku na zdrowe tkanki w trakcie prowadzenia chemioterapii u chorych na nowotwory, a także do badań farmakokinetyki leku (*Brigagão* i in. 2016; *Mistran* i in. 2010; *Sripuram* i in. 2010; *Zhou Q.*, *Chowbay B.* 2002).

Większość stosowanych metod do ilościowego oznaczania chlorowodoru doksorubicyny i jego metabolitów w materiale biologicznym bazuje na

analizie pochodnych tego związku z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Innym rozwiązaniem umożliwiającym wyizolowanie chlorowodoru doksorubicyny i jego metabolitów jest ekstrakcja do fazy stałej lub ekstrakcja ciecz – ciecz. Dużym uproszczeniem jest oznaczanie tych związków po wytrąceniu białek zawartych w materiale biologicznym. Po odwirowaniu osadu roztwór analizuje się metodą HPLC/FL na kolumnie Xtera C-18 (150 x 4,6), stosując fazę ruchomą 50 mmol/L buforu fosforowego (pH 2), acetonitrylu i propanolu (65: 25: 2, v/v/v), detektor fluorescencyjny długości fali wzbudzenia – 480 nm, emisji 560 nm. Limit detekcji 10 ng/ml.

Zastosowanie RP-HPLC, kolumny C18, detektora UV-VWD oraz fazy ruchomej o składzie 0,05 mol/l wodorofosranu disodowego i acetonitrylu (65: 35) z dodatkiem 0,5 ml/l trietyloaminy umożliwiło jednoczesne oznaczanie 5-fluoracylu, chlorowodoru doksorubicyny i cyklofosfamidu w płazmie na poziomie 98 ng/ml (*Ahmad* i in. 2011).

Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie frakcji wdychalnej aerozolu chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu środowiska pracy na poziomie około $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$, tj. około 1/10 proponowanej wartości dopuszczalnego stężenia przez ACGIH.

Metoda badań

Ze względu na posiadane możliwości aparaturowe, do oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DXO) w powietrzu na stanowiskach pracy zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną (DAD), podczas badań nad: ustaleniem parametrów wyodrębniania z powietrza, przygotowaniem pobranej próbki powietrza do analizy i ilościowym oznaczaniu badanej substancji.

Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Elite LaChrom Merck – Hitachi i detektor DAD L-2450 z automatycznym podajnikiem próbek L2200 oraz kolumnę analityczną C-18 wypełnioną żelem

krzemionkowym modyfikowanym (ang. *endcapend phurosphere star* RP-18) o wymiarach 250 x 4,6 mm i uziarnieniu $5 \mu\text{m}$ z przedkolumną (firmy Merck, Niemcy). Do pobierania i przygotowania próbek powietrza do badań stosowano: aspirator Leland (SKC Inc., USA), próbnik do wyodrębniania cząstek aerozolu zgodnie z wymaganiami dla frakcji wdychalnej, typ I.O.M. (firma Anglia), wytrząsarkę mechaniczną WL-2000 (JWElectronic, Polska), wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA).

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: chlorowodorek doksorubicyny (European Pharmacopea Referency Standard, Teva Pharmaceutical, Polska), kwas fosforowy cz.d.a. (POCH S.A., Polska), acetonitryl o czystości do HPLC (Merck, Niemcy), wodorofosforan sodu – Na_2HPO_4 (POCH S.A.), kwas fosforowy – H_3PO_4 (POCH S.A.), trietyloaminę – TEA (Sigma-Aldrich), 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 do cieczy i inne.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

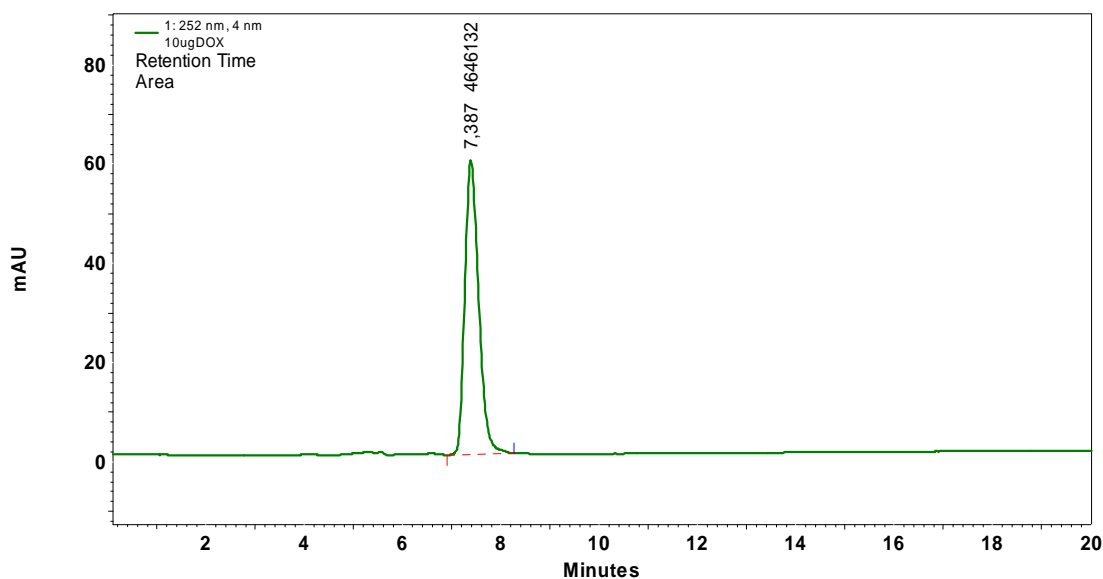
Ustalenie warunków oznaczania chromatograficznego

Do oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DXO) zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją diodową. Badania prowadzono, stosując kolumnę analityczną RP-18 (ang. *endcapend phurosphere star*) w układzie faz odwróconych.

Do oznaczania chlorowodoru doksorubicyny zastosowano acetonitryl i wodę (25: 75 v/v), stosując przepływ $0,1 \text{ ml}/\text{min}$ i prowadząc pomiar przy długości fali detektora $\lambda = 254 \text{ nm}$ (*Sripuram* i in. 2010). Stosując proponowane warunki uzyskano rozmyty pik w czasie 6 min. W celu poprawy wykrywalności zamieniono skład fazy ruchomej. Użyto mieszaniny ACN/ H_2O w stosunku 75: 25. Znacznie

skróciło to czas analizy, pik dla chlorowodoru doksorubicyny otrzymano w czasie 0,6 min, a całkowity pomiar nie przekraczał 2 min. Uzyskany sygnał był w dalszym ciągu rozmyty, pik nie był gaussowski co uniemożliwiało prawidłowy odczyt wyniku.

Do elucji chlorowodoru doksorubicyny zastosowano acetonitryl (ACN): 0,01 M wodorofosforan amonu ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), (45: 55) z kwasem octowym $\text{pH} = 6,2$ o przepływie $0,3 \text{ ml}/\text{min}$, stosując kolumnę termostatowaną o temperaturze $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i objętości dozowanej próbki – $10 \mu\text{l}$. Prowadząc pomiar przy długości fali detektora $\lambda = 254 \text{ nm}$ otrzymano pik w czasie retencji $t_r = 7,83 \text{ min}$ (rys. 1.). Warunki te pozwalają na oznaczanie chlorowodoru doksorubicyny w układzie faz odwróconych na stosunkowo wysokim poziomie $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ (*Mistran* 2010).



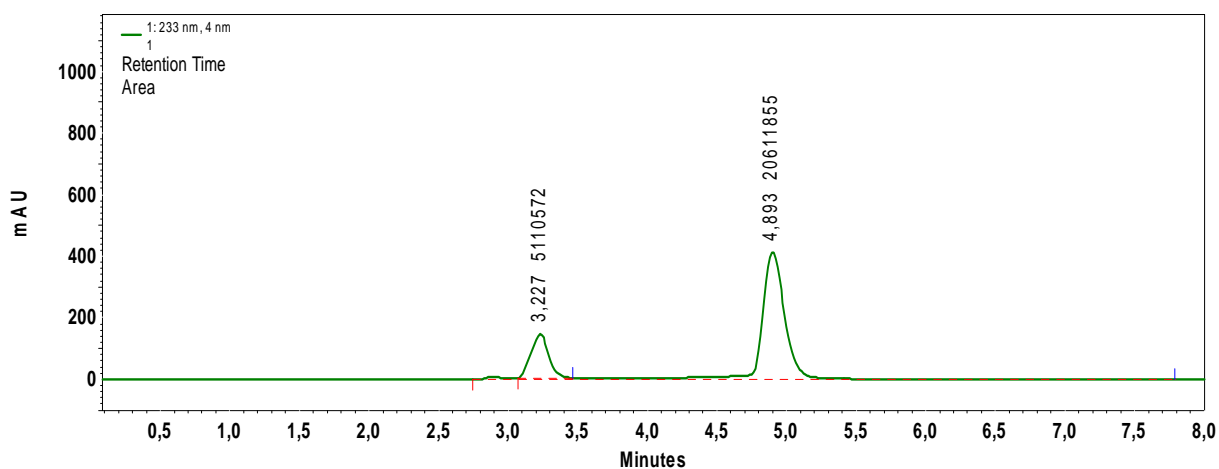
Rys 1. Chromatogram roztworu wzorcowego chlorowodoru doksorubicyny (DXO)

W celu poprawy oznaczalności chlorowodoru doksorubicyny (jako eluentu) wykorzystano mieszaninę buforu fosforanowego i acetonitrylu (ACN) z dodatkiem trietyloaminy (TEA), (Ahmad 2010).

Pozostałe parametry układu przedstawiono w tabeli 2. Zastosowane warunki pozwoliły na oznaczenie chlorowodoru doksorubicyny w obecności fluorouracilu (rys. 2).

Tabela 2.
Warunki oznaczania chromatograficznego chlorowodoru doksorubicyny (DXO)

Parametry	Ustalone warunki
Kolumna	250 x 4,6 mm, 5 μ m
Temperatura kolumny	25 °C
Faza ruchoma	0,05M (wodorofosforan sodu) Na ₂ HPO ₄ acetonitryl (ACN), (65: 35) o pH = 3,7 (H ₃ PO ₄) + 0,5ml/L fazy trietyloaminy (TEA)
Strumień objętości	0,65 ml/min
Detektor	UV-VIS
Długość fali	266 nm
Objętość pętli	20 μ l



Rys 2. Chromatogram mieszaniny wzorcowej: 1 – fluorouracil, 2 – chlorowodorek doksorubicyny

Badanie wymywania i zatrzymywania chlorowodoru doksorubicyny na filtrach

Chlorowodorek doksorubicyny (DXO) jest emitowany do powietrza stanowisk pracy w postaci aerozolu cząstek stałych, w procesie produkcji leku lub aerozolu cieczy, podczas przygotowywania i stosowania wlewów lub 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 chlorowodoru doksorubicyny z filtrów zastosowano wodę destylowaną, ponieważ substancja ta jest rozpuszczalna w wodzie.

Przeprowadzono badania stopnia odzysku chlorowodoru doksorubicyny z filtrów. W pięciu kolbach stożkowych Erlenmayera umieszczono filtry z włókna szklanego i naniesiono po 100 µl roztworu chlorowodoru doksorubicyny o stężeniu

25,0 µg/ml. Filtry pozostawiono do wyschnięcia. Następnie do kolb dodano po 3 ml wody destylowanej i wytrząsano przez 30 min, stosując wytrząsarke mechaniczną. Roztwory porównawcze przygotowano w identyczny sposób, ale bez filtrów. Średni współczynnik odzysku wyniósł 0,85.

Badania wyodrębniania chlorowodoru doksorubicyny z powietrza przeprowadzono w następujący sposób. Dwa filtry z włókna szklanego umieszczono w oprawce do próbnika I.O.M. Na pierwszy filtr naniesiono 100 µl roztworu chlorowodoru doksorubicyny w wodzie destylowanej o stężeniu 100,0 µg/ml, a na drugi filtr nie nanoszono badanej substancji i przepuszczano 4 800 litrów powietrza ze strumieniem objętości 10 l/min. Analit wymywano z filtrów 3 ml wody destylowanej. Wykonano również próby po naniesieniu na pierwszy filtr 200 µl roztworu chlorowodoru doksorubicyny w wodzie destylowanej o stężeniu 100,0 µg/ml. Na podstawie wyników badań przedstawionych w tabeli 3. wykazano, że chlorowodorek doksorubicyny zatrzymuje się na pierwszym filtrze z włókna szklanego. Drugi filtr nie zawierał badanej substancji w żadnym z testowanych zestawów.

Tabela 3.

Przykładowe wyniki pochłaniania i wymywania chlorowodoru doksorubicyny (DXO) z filtrów z włókna szklanego. Kolumna C18, faza ruchoma: mieszanina 0,05 mol/L wodorofosforanu disodu i acetonitrylu (65: 35) o pH = 3 z dodatkiem 0,5 mL/L trietyloaminy (45: 55)

Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/min	Czas pochłaniania, min	Przybliżone stężenie DOX w powietrzu, µg/m ³	Średnie pole powierzchni pików pochodnej DOX w roztworach po wymyciu, wg wskazań integratora	
			I filtr	II filtr
10,0	480	2,0	579250	n.w.
			576402	n.w.
			583241	n.w.
		4,0	1240088	n.w.
			1170085	n.w.

Objaśnienia: n.w. – nie wykryto.

Uzyskane wyniki wskazują, że filtr z włókna szklanego zapewnia ilościowe wyodrębnienie chlorowodoru doksorubicyny z badanego powietrza przy pobieraniu próbki o objętości 4800 L, a woda

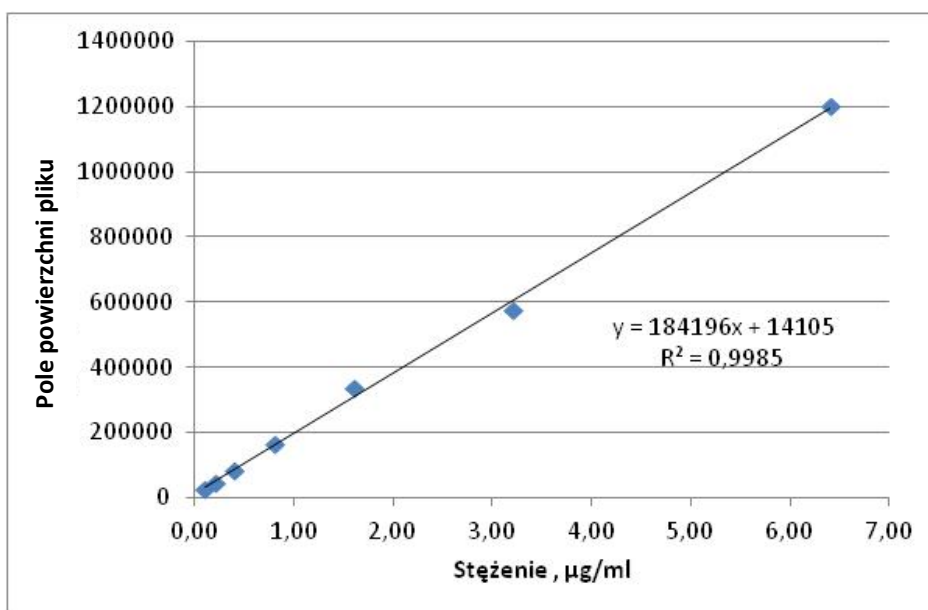
destylowana jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do wymywania tej substancji z filtrów.

Kalibracja

Przygotowano trzy serie roztworów kalibracyjnych o stężeniach $0,10 \div 6,4 \mu\text{g/ml}$. Do chromatografu wprowadzano za pomocą pętli dozowniczej po $20 \mu\text{l}$ roztworów wzorcowych roboczych. Z każdego roztworu wzorcowego wykonywano dwukrotny pomiar, odczytywano powierzchnie pików i obliczano średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie była większa niż $\pm 5\%$ tej wartości. Następnie wykreślano krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych

zawartość chlorowodoru dokсорubicyny w 1 ml roztworów wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików. Przykładowy wykres krzywej kalibracji przedstawiono na rysunku 3., a wyniki kalibracji w tabeli 4.

W badanym zakresie stężeń uzyskano liniowy przebieg krzywej wzorcowej ze współczynnikiem korelacji 0,9953.



Rys. 3. Krzywa kalibracji chlorowodoru dokсорubicyny (DXO)

Tabela 4.
Wyniki kalibracji chlorowodorku doksorubicyny (DXO)

Stężenie, x $\mu\text{g/ml}$	Średnia powierzchnia pików, y_{sr} wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III ($y_{\text{sr. I-III}}$)	Odchylenie standardowe, S	Współczynnik zmienności, $V, \%$ $V = (S/y_{\text{sr. I-III}})100\%$	Współczynnik Kalibracji, B ($f(c) = y/x$)
	I seria	II seria	III seria				
6,40	1200085	1203816	1195095	1199665	4 376	0,36	191946
3,20	576402	579032	571672	575702	3 730	0,65	182184
1,60	335765	332982	339463	336070	3 251	0,97	215429
0,80	161502	156885	185068	167818	3 317	9,01	215152
0,40	85236	84936	85629	85267	348	0,41	236853
0,20	45620	44875	45942	45479	547	1,2	126331
0,10	28319	27424	28319	28021	517	1,84	311341
Krzywa kalibracji $Y = Bx + A$	$y = 226105,78x - 78647,82$	$y = 226695,1x - 82705,2$	$y = 226769,64x - 82014,86$	$y = 226523,51x - 81122,63$			
Współczynnik korelacji, R	0,9977	0,9977	0,9975	0,9976			
Średnia wartość współczynnika kalibracji			390735				
Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji, S_b			44027				
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, $n_{\text{kal}}, \%$			11				

Walidacja metody

W celu wyznaczenia precyzji etapu analitycznego z niezależnych roztworów podstawowych przygotowano trzy serie pomiarowe o stężeniach odpowiednio: 0,1; 3,2; 6,4 $\mu\text{g/ml}$ po cztery roztwory wzorcowe każda. Następnie każdy z roztworów poddano analizie chromatograficznej.

Na podstawie odczytanych powierzchni pików obliczono precyzję oznaczania. Średnia precyzja oznaczania chlorowodoru dokсорubicyny (DXO) wyniosła 5,25. Wyniki badania precyzji oznaczania chlorowodoru dokсорubicyny przedstawiono w tabeli 5.

Granice wykrywalności (LOD) obliczano na podstawie wartości odchylenia standardowego zbioru sygnałów dla ślepej próby (zerowej) i kąta nachylenia krzywej kalibracji – współczynnika kierunkowego B . W celu obliczenia odchylenia standardowego, z wyników uzyskanych dla serii próbek

ślepych (zerowych) przeprowadzono dziewięć niezależnych pomiarów powierzchni pików przy czasie retencji chlorowodoru dokсорubicyny (3,04 min) dla próbki przygotowanej w identyczny sposób jak próbka rzeczywista, bez analitu. Wyniki pomiarów dla ślepej próby pozwoliły na uzyskanie granicy wykrywalności na poziomie 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ i granicy oznaczalności 0,0015 $\mu\text{g/ml}$ chlorowodoru dokсорubicyny w próbce. Wyniki przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 5.
Wyniki badania precyzji oznaczania chlorowodorku doksorubicyny (DXO)

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 6,4 µg/ml		II seria – roztwór o stężeniu 3,2 µg/ml		III seria – roztwór o stężeniu 0,1 µg/ml	
1141562	1 141 205	484702	484 132	23489	22 839
1140848		483561		22189	
1143161	1 141 089	481289	481 262	23517	23 954
1139016		481235		24390	
1133761	1 135 016	483748	482 599	23084	23 083
1136270		481449		23082	
1134292	1 133 128	481537	481 498	23752	23 415
1131964		481458		23078	
Średnia powierzchnia pików	1 137 609	Średnia powierzchnia pików	482 372	Średnia powierzchnia pików	23 323
Odchylenie standardowe, <i>S</i>	4 112.53	Odchylenie standardowe <i>S</i>	1 393.16	Odchylenie standardowe, <i>S</i>	637.95
Współczynnik zmienności, <i>V</i> ₁ , %	0.36	Współczynnik zmienności, <i>V</i> ₂ , %	0.29	Współczynnik zmienności, <i>V</i> ₃ , %	2.74
Średnia precyzja					
średni współczynnik zmienności dla zakresu, <i>V</i> _{zakresu} , %		1.6043			
Całkowita precyzja badania – średni współczynnik zmienności, <i>V</i> _c , %		5.2511			

Tabela 6.
Granica oznaczalności i wykrywalności

	Ślepe próby		
	odpowieź detektora wg wskazań analitycznej stacji komputerowej, powierzchnia pików chromatograficznych o czasie retencji – 3,04 min		
	1	2	3
	180	167	138
	78	212	149
Wyznaczone parametry	138	156	153
	104	170	182
	114	195	234
Odchylenie standardowe dla jednej serii próbek	38,54	22,88	38,69
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0	33,37		
Równanie krzywej kalibracji: $y = Bx + A$	$y = 226562,28x - 82488,73$		
Współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji, B	226562,28		
Granica wykrywalności, LOD	0,0005		
Granica oznaczalności, LOQ	0,0015		

Wyniki wyznaczonych wartości niepewności opracowanej metody przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7.
Niepewność całkowita i rozszerzona metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DXO)

Oznaczany parametr	Wartość
Średnia wydajność współczynnika desorpcji/odzysku	0,85
Całkowita precyzja badania – średni współczynnik zmienności dla zakresu, V_c , %	5,251
Względna niepewność całkowita, U_T , %	11,502
Niepewność rozszerzona, U	23,004

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano selektywną metodę oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DXO) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV).

Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtr z włókna szklanego umieszczony w próbniku do pobierania frakcji wdychalnej aerozolu, z którego chlo-

rowodorek doksorubicyny wmywano wodą destylowaną. Do oznaczania pochodnej chlorowodoru doksorubicyny zastosowano kolumnę analityczną C18 wypełnioną modyfikowanym żelazem krzemionkowym, którą eluowano mieszaniną 0,05 mol/L wodorofosforanu disodu i acetonitrylu (65: 35) o pH = 3 z dodatkiem 0,5 mL/L trietyloaminy. Ustalone warunki pozwalają na selektywne oznaczanie chlorowodoru doksorubicyny w obecności innych substancji

występujących w powietrzu na różnych etapach produkcji i stosowania leku.

Opracowana metoda oznaczania stężeń chlorowodoru doksorubicyny może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy do wykonywania pomiarów stężeń tej substancji w powietrzu na stano-

wiskach 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.

PIŚMIENNICTWO

- Ahmad M., Usman M., Madni A., Zubair M., Zaman Q., Qureshi M.S., Munir A., Ahmad M., Mahmood A.* (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. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(7), 915–922.
- Brigagão da Silva P. C., Prado Julio I., Engler Donadel G., Martins I.* (2016). UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil in surface samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 82, 68–73.
- Doxorubicin hydrochloride solution for injection (2015). Karta charakterystyki. Firma Pfizer.
- Doxorubicin hydrochloride (2017). Karta Charakterystyki. Sigma Aldrich [dostęp: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515?lang=pl®ion=PL>].
- IARC (1993) Lists of IARC Evaluations. International Agency For Research on Cancer 2017.
- Indeks Leków Medycyny Praktycznej (2005). Kraków, Medycyna Praktyczna.
- Krzemińska S., Szewczyńska M., Pośniak M.* (2016). Stosowanie środków ochrony indywidualnej w warunkach zawodowego narażenia na cytostatyki. *Medycyna Pracy* 67(4), 427–433.
- Leki przeciwnowotworowe (2015). [W:] *Farmakologia Goodmana & Gilmana* [Red.] L.L. Bruntona, J.S. Laza, K.L. Parker. Warszawa, Wydawnictwo: Czelej.
- Mistran A.F., Dzarr A. A.* (2010). Gan S.H., HPLC method development and validation for simultaneous detection of Arabinoside-C and doxorubicin. *Toxicology Metchanisms and Method* 20(8), 472–48.
- Siripuram V. K., Harish K., Satish K. B., Krishna D.* (2010). Determination and validation of rapid and sensitive HPLC method for the quantitative determination of doxorubicin in human plasma. *Clinical Research and regulatory Affairs* 27(3), 75–81.
- Trevisan M.G., Poppi R.J.* (2003). Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. *Analytica Chimica Acta* 493, 69–81.
- Zhou Q., Chowbay B.* (2002). Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30, 1063–1074.
- 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 dyrektywy 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., s. 1–1355 ze zm.
- PN-EN 482: 2012 Powietrze na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczą charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA CHLOROWODORKU DOKSORUBICYNY W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości chlorowodorku doksorubicyny (CAS 25316-40-9) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie chlorowodorku doksorubicyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczenia opisanych w procedurze, wynosi około 0,06 µg/m³ przy pobraniu 4800 l 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 osadzonego na filtrze chlorowodorku doksorubicyny wodą destylowaną 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 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. Acetonitryl

4.2. Chlorowodorek doksorubicyny.

Stosować wzorzec wg Farmakopei Europejskiej

4.3. Kwas fosforowy

4.4. Trietyloamina

4.5. Wodorofosforan disodu

4.6. Roztwór wzorcowy podstawowy chlorowodorku doksorubicyny

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

4.7. Roztwór roboczy pośredni

Do kolby miarowej o objętości 5 ml odmierzyć 125 µl roztworu podstawowego chlorowodorku doksorubicyny i uzupełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi około 25 µg/ml.

4.8. Roztwory wzorcowe robocze

Do kolb miarowych o objętości 10 ml odmierzyć: 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 i 1,28 ml roztworu pośredniego i dopełnić wodą do kreski. Zawartość chlorowodorku doksorubicyny w tak przygotowanych roztworach wzorcach wynosi odpowiednio około: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 i 3,2 µg.

4.9. 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

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem diodowym.

5.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną umożliwiającą oznaczanie pochodnej chlorowodoru dokсорubicyny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, 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 wdychalnej aerozolu.

5.4. Strzykawki do cieczy

Stosować strzykawki do cieczy o pojemności od 5 μl do 2,5 ml.

5.5. Kolby

Stosować kolby stożkowe Erlenmayera o pojemności 25 ml, wyposażone w korki.

5.6. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg punktu 6.

5.7. Wyrząsarka mechaniczna

Stosować wyrząsarkę mechaniczną.

6. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 4.9. umieszczony w próbniku wg punktu 5.3., przepuścić do 4800 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości 10 l/min lub innym (zgodnie z instrukcją próbника 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 chlorowodoru dokсорubicyny 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 – 0,05 mol/L wodorofosforan disodu:
acetonitryl 65: 35
(pH = 3,7 kwas fosforowy,
0,5 mL/L trietyloaminy)
- strumień objętości
fazy ruchomej 0,65 ml/min
- temperatura kolumny pokojowa
- długość fali analitycznej
detektora diodowego 266 nm
- objętość dozowanej próbki 20 μl .

8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Wprowadzić do chromatografu za pomocą pętli dozowniczej po 20 μl roztworów wzorcowych roboczych wg punktu 4.8. 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 $\pm 5\%$ tej wartości. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość chlorowodoru dokсорubicyny 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 100 μl roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 4.6. 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 4. i wstrząsać zawartością kolb przez 30 min, stosując wyrząsarkę wg punktu 5.7.

Jednocześnie wykonać oznaczanie badanej substancji, co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 3 ml wody po 100 μl roztworu do wyznaczania współczynnika odzysku wg punktu 4.7. Oznaczanie badanej substancji wykonać wg punktu 10.

Współczynnik odzysku chlorowodoru doksorubicyny (d) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

P_d – średnia powierzchnia pików pochodnej chlorowodoru doksorubicyny na chromatogramach roztworów po desorpcji,

P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji pochodnej chlorowodoru doksorubicyny na chromatogramach roztworu kontrolnego,

P_p – średnia powierzchnia pików pochodnej chlorowodoru doksorubicyny na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku pochodnej chlorowodoru doksorubicyny (\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 5.7. Następ-

nie pobrać 70 μ l roztworu z nad filtra i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 7. Wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików chlorowodoru doksorubicyny według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość chlorowodoru doksorubicyny w 1 ml badanego roztworu z nad filtra odczytać z wykresu krzywej wzorcowej, w mikrogramach.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie chlorowodoru doksorubicyny (X) w badanym powietrzu obliczyć, w mikrogramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

$$X = \frac{3 \cdot m}{V},$$

w którym:

m – zawartość chlorowodoru doksorubicyny w 1 ml roztworu uzyskanego po wymyciu filtra, odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,

V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w metrach sześciennych,

3 – współczynnik przeliczeniowy wynikający z objętości roztworu użytego do wymywania z filtra i użytego do analizy.