

Etopozyd – frakcja wdychalna

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy¹

Etoposide – inhalable fraction

Determination in workplace air

mgr MARZENA BONCZAROWSKA
e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl
mgr inż. KAROLINA MIKOŁAJEWSKA
e-mail: karolina.mikolajewska@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 33419-42-0

Słowa kluczowe: etopozyd, cytostatyki, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy, frakcja wdychalna.

Keywords: etoposide, cytostatics, analytical method, liquid chromatography, workplace air, inhalable fraction.

Streszczenie

Etopozyd w temperaturze pokojowej jest ciałem stałym występującym w postaci białego lub żółto-brązowego, krystalicznego proszku bez zapachu. Jest substancją bardzo dobrze rozpuszczalną w metanolu i chloroformie. Głównym skutkiem toksycznego działania etopozydu jako leku jest supresja czynności szpiku kostnego oraz objawy ze strony układu pokarmowego, np.: nudności, wymioty, skurcz oskrzeli, stany zapalne błon śluzowych, uczucie niesmaku w ustach, łysienie oraz wtórne białaczki. Narazenie zawodowe na etopozyd dotyczy głównie pracowników służby zdrowia oraz osób zatrudnionych przy produkcji tego leku. Etopozyd

może dostawać się do organizmu przez skórę lub drogą inhalacyjną.

Eksperti Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowali etopozyd jako czynnik prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (grupa 2.A).

Celem pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania stężeń frakcji wdychalnej etopozydu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od 1/10 do 2 zaproponowanej wartości NDS, zgodnie z wymaganiami normy europejskiej PN-EN 482+A1:2016-01.

Do badań zastosowano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników IV etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Naukowe Centrum Badań i Rozwoju.

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

Rozdziałów chromatograficznych dokonywano przy użyciu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 o wymiarach 150 x 3 mm, o uziarnieniu 5 µm, którą wymywano mieszaniną metanolu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego.

Metoda polega na: wyodrębnieniu frakcji wdychalnej i zatrzymaniu obecnego w powietrzu etopozydu na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny metanol: woda z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu. Zaproponowany sposób ekstrakcji etopozydu z filtrów umożliwia wysoki odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku wynosi blisko 95%. Zależność wskazań detektora mas w funkcji stężeń etopozydu ma charakter liniowy ($r = 0,9985$) w zakresie stężeń 0,036 ÷

1,44 µg/ml. Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego wynoszą odpowiednio 0,0026 i 0,0086 µg/ml.

Zastosowanie w oznaczeniach tandemowego spektrometru mas pozwala na selektywne i specyficzne oznaczenie etopozydu z frakcji wdychalnej w obecności innych leków cytotatycznych. Metoda zapewnia możliwość oznaczenia etopozydu na poziomie 0,0001 mg/m³, tj. na poziomie 1/20 zaproponowanej wartości NDS oraz spełnia wymagania normy PN-EN 482+A1:2016-01 stawiane procedurom oznaczania czynników chemicznych.

Metoda oznaczania etopozydu została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

Summary

Etoposide at room temperature is a fine white to yellow-brown crystalline odorless powder. Etoposide is one of the most widely used cytotoxic drugs and has strong antitumour activity in cases of small-cell lung cancer, testicular cancer or lymphoma. Occupational exposure to etoposide (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 etoposide can cause suppression of bone marrow function and gastrointestinal symptoms such as nausea, vomiting, bronchospasm, inflammation of mucous membranes, hair loss and secondary leukemia. Agency for Research on Cancer (IARC) has classified etoposide as a compound probably carcinogenic to humans (Group 2.A) and in combination with cisplatin and bleomycin as carcinogenic to humans (Group 1).

The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for determining inhalable fraction of etoposide concentrations 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 tandem mass detection (HPLC-MS/MS). All chromatographic analysis were performed with Supelcosil LC 18 150 × 3 mm analytical column, which

was eluted with a mixture of methanol and water with 0.1% of formic acid.

This method is based on collecting inhalable fraction of etoposide 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 etoposide from filters was 90%. The method is linear ($r = 0.9985$) within the investigated working range from 0.036 µg/ml to 1.44 µg/ml. The calculated limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.0086 and 0.0026 µg/ml, respectively.

The analytical method described in this paper, thanks to HPLC MS/MS technique, enables specific and selective determination of inhalable fraction of etoposide in workplace air in the presence of other compounds at concentrations from 0.0001 mg/m³ (1/20 proposed MAC value). The method is precise, accurate and it meets the criteria for measuring chemical agents listed in Standard No. EN 482. The method can be used for assessing occupational exposure to etoposide and associated risk to workers' health. The developed method of determining etoposide has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

WPROWADZENIE

Etopozyd w temperaturze pokojowej jest ciałem stałym występującym w postaci białego lub żółto-brązowego, krystalicznego proszku bez zapachu. Jest substancją bardzo dobrze rozpuszczalną w metanolu i chloroformie, słabo rozpuszcza się w etanolu, a rozpuszczalność w wodzie wynosi 58,7 mg/l (HSDB 2005).

Etopozyd jest lekiem przeciwnowotworowym o działaniu cytotoksycznym oraz antymitotycznym. Jest stosowany do leczenia: nowotworów jądra, ostrej białaczki szpikowej, raka płuca, niedrobnokomórkowego raka płuca, raka kory nadnerczy, raka żołądka, ostrej białaczki limfoblastycznej i nowotworów mózgu. Etopozyd podawany jest również

w terapii mięsaka Ewinga oraz mięsaka Kaposiego skojarzonego z AIDS.

Głównym skutkiem toksycznego działania etopozydu jako leku jest supresja czynności szpiku kostnego oraz objawy ze strony układu pokarmowego, np.: nudności, wymioty, skurcz oskrzeli, stany zapalne błon śluzowych, uczucie niesmaku w ustach, łysienie oraz wtórne białaczki (Soćko 2017).

Narażenie zawodowe na etopozyd dotyczy głównie pracowników służby zdrowia (farmaceutów, pielęgniarek, lekarzy, salowych) oraz osób zatrudnionych przy produkcji tego leku. Źródłem narażenia na ten związek mogą być czynności związane z: przygotowywaniem preparatów w aptekach szpitalnych, otwieraniem ampulek, aplikacją leków pacjentom a także: kontakt z materiałem biologicznym, brudną odzieżą szpitalną oraz z zanieczyszczonymi powierzchniami roboczymi.

Eksperti Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowali etopozyd jako czynnik prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (grupa 2.A), (IARC 2000), a w połączeniu z cisplatyną i bleomycyną jako rakotwórczy dla ludzi (grupa 1.), (IARC 2012).

Etopozyd nie jest klasyfikowany urzędowo w Unii Europejskiej i nie ma klasyfikacji zharmonizowanej (Rozporządzenie... 2008).

W większości przypadków producenci etopozydu klasyfikują go pod względem działania rakotwórczego (Carc 1B, H350) i ostrej toksyczności po narażeniu drogą pokarmową (Acute Tox. 4, H302), (ECHA 2017).

W Polsce brak jest obecnie wartości normatywu higienicznego dla etopozydu. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Najwyższych Dopuszczalnych Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował przyjęcie wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla frakcji wdychalnej etopozydu na poziomie 0,002 mg/m³, stwierdzając jednocześnie, że nie ma merytorycznych podstaw do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh), (Soćko 2017).

Celem pracy było opracowanie odpowiednio czulej i selektywnej metody oznaczania etopozydu we frakcji wdychalnej w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary jego stężeń, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura, materiały i odczynniki

Do badań zastosowano 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 (MassLynx 4.0). Rozdziałów chromatograficznych dokonywano na kolumnie analitycznej Supelcosil LC-18 o wymiarach 150 × 3 mm, o uziarnieniu 5 μm, wypełnionej fazą oktadecylową (C-18). Do detekcji zastosowano sprzężony z chromatografem tandemowy spektrometr mas Micromass Quattro Micro API. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory indywidualne GilianAir-3 wyposażone w głowicę typu IOM (ang. *Personal Inhalable PM Sampler*), umożliwiającą pobieranie frakcji wdychalnej. Substancje wzorcowe odważano, stosując wagę analityczną Sartorius Research, a do ekstrakcji próbek stosowano wytrząsarkę rotacyjną.

Wszystkie badania wykonano z zastosowaniem następujących materiałów i odczynników:

- filtry z włókna szklanego GF/A 25 mm (Whatman)
- filtry strzykawkowe z membraną z PTFE (Supelco)
- kolby miarowe 2 ml 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
- etopozyd (Fluka)
- kwas mrówkowy (POCH)
- metanol do LC-MS (JT Baker)
- woda do HPLC.

Warunki oznaczania chromatograficznego

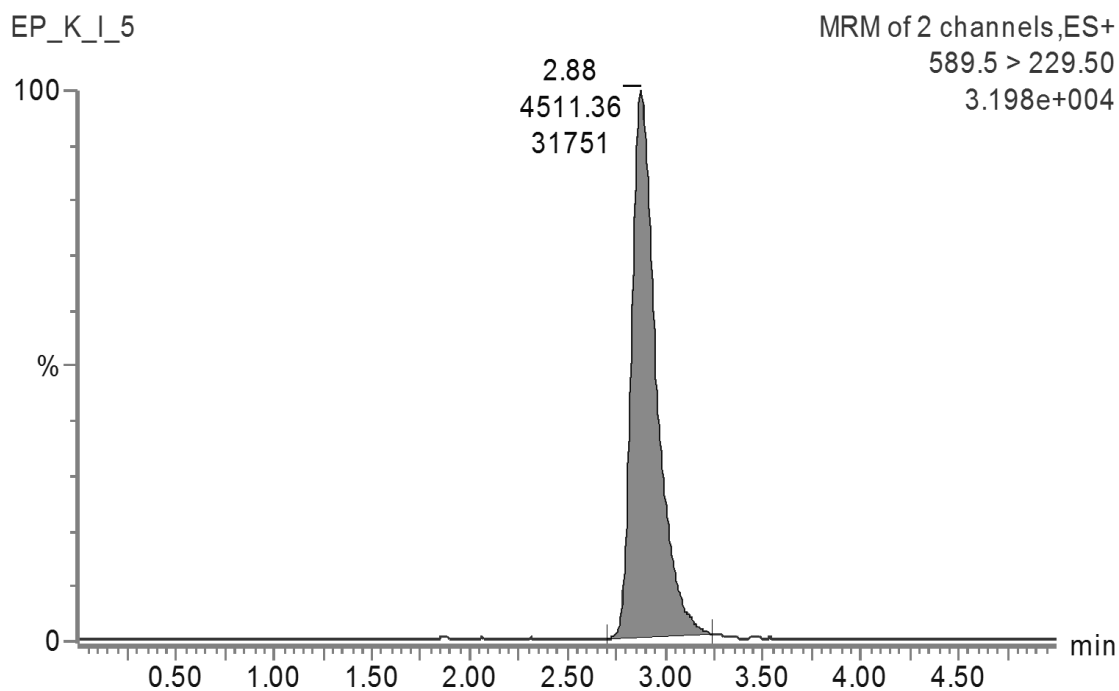
Z danych literaturowych wynika, że do oznaczania etopozydu w powietrzu są stosowane takie techniki chromatograficzne, jak wysokosprawna

chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV), (Fleming, Stewart 1991; Hayat i in. 2011) lub wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową detekcją mas (HPLC/MS/MS), (Akhtar i in. 2013; Chen, Uckun 2000; Dhanaraju i in. 2013; Fabrizi i in. 2016; Fransman i in. 2007; Negreira i in. 2013). Pierwsza z wymienionych technik nie zapewnia (dla zaproponowanej wartości NDS) możliwości uzyskania odpowiedniej czułości oznaczeń. Druga (HPLC/MS/MS) pozwala na uzyskanie odpowiedniej czułości oznaczeń oraz, dzięki zastosowaniu tandemowego spektrometru mas, zapewnia możliwość selektywnego oznaczania etopozydu w próbce.

Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy etopozydu techniką LC-MS/MS wykonywano z użyciem kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 o wymiarach 150 × 3,0 mm, o uziarnieniu 5 μm. Jako fazę ruchomą (elucję izokratyczną) zastosowano mieszaninę metanolu i wody z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego. Optymalizacji poddano takie parametry pracy detektora mas, jak: napięcia – kapilary sondy ESI, źródła jonów, ekstraktora i soczewek; temperatury – desolwatacji i źródła jonów; przepływy gazów oraz parametry pracy komory kolizyjnej. Charakterystyczna dla etopozydu fragmentacja w komorze kolizyjnej

jonu molekularnego (M+H⁺), (m/z 589,5) do jonu potomnego (m/z 229,5) została dobrana na podstawie danych literaturowych (Fabrizi i in. 2016; Fransman i in. 2007).

Optymalne warunki pracy stosowanego podczas opracowywania metody zestawu LC-MS/MS podano w tabeli 1. Zastosowanie tandemowego spektrometru mas zapewnia w danych warunkach analitycznych selektywność oznaczeń etopozydu w przypadku obecności innych cytostatyków. Analit po rozdziale na kolumnie chromatograficznej jest wprowadzany przez sondę ESI (ang. *electrospray ionisation*) do tandemowego spektrometru mas (MS/MS), gdzie ulega jonizacji, a następnie fragmentacji w komorze kolizyjnej. Jon molekularny etopozydu (M+H⁺) m/z 589,5 ulega fragmentacji w komorze kolizyjnej, w wyniku czego powstaje jon potomny m/z 229,5. 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 podlega fragmentacji charakterystycznej dla etopozydu. Przykładowy chromatogram mieszaniny: etopozydu, cyklofosfamidu i metotreksatu przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Chromatogram mieszaniny wzorców: etopozydu, cyklofosfamidu i metotreksatu na kolumnie Supelcosil LC-18 150 x 3 mm, uzyskany w trybie rejestracji MRM (ang. *multiple reaction monitoring*) charakterystycznej dla etopozydu

Tabela 1.
Warunki pracy chromatografu cieczonego z detektorem mas

Kolumna analityczna	Supelcosil™ LC-18 150 x 3 mm x 5 µm	
Faza ruchoma (izokratycznie)	metanol z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego: woda z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego, 70: 30	
Warunki pracy spektrometru	jonizacja	ES +
Fragmentacja jonów: tryb MRM (ang. <i>multiple reaction monitoring</i>)	napięcie kapilary	3,0 kV
CP: 589,5→229,5	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	0,3 ml/min	
Temperatura kolumny	40 °C	
Objętość próbki	10 µl	

Zgodnie z wymaganiami normy (PN-EN 482+A1:2016-01) metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu od 1/10 do 2 wartości obowiązującego NDS.

Próbki powietrza do oznaczania etopozydu należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie (PN-Z-04008-7:2002 wraz z późniejszą zmianą) za pomocą aspiratorów indywidualnych, umożliwiających pobieranie powietrza ze strumieniem objętości 2 l/min.

Własności fizykochemiczne etopozydu (stan skupienia w temperaturze pokojowej, prężność par) świadczą o tym, że w środowisku pracy związek ten może występować głównie w postaci pyłu. Z tego względu do pobierania próbek powietrza można zastosować filtry umożliwiające zatrzymanie obecnego w powietrzu związku. Taki sposób pobierania próbek powietrza był wykorzystywany w pracach dotyczących inhalacyjnego narażenia na cytostatyki, w tym na etopozyd (Fransman i in. 2007).

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na retencję etopozydu na filtrach z włókna szklanego przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 20 µl roztworów wzorcowych etopozydu o stężeniach: 7,2; 36 i 144 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w głowicach do pobierania

próbek powietrza frakcji wdychalnej i, zgodnie z zaleceniami producenta, 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 metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego 0,1% i ekstrahowano przez 30 min za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. 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 aeracji wielkości pól powierzchni pików uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów, na które naniesiono takie same stężenia etopozydu i nie przepuszczano powietrza.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2. Z analizy tych danych wynika, że przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje istotnych strat ilościowych etopozydu zatrzymanego na filtrach szklanych. Średnie wartości współczynników wydajności ekstrakcji etopozydu z filtrów poddanych aeracji wynoszą dla stężeń: 0,072; 0,36 i 1,44 µg/ml odpowiednio: 105,4% (SD 7,02); 91,7% (SD 1,6) i 87,3% (SD 3,9).

Tabela 2.
Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń etopozydu

Medium pochłaniające	Zawartość etopozydu na filtrze, µg	Pole powierzchni piku		Wydajność ekstrakcji, %	Średnia wartość wydajności ekstrakcji, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,144		528,5	103,7	105,4
			507,4	99,6	
			442,15	11,9	
			511,71	104,9	
			574,62	112,7	
	0,72		502,9	98,7	
				<i>SD</i> 7,02	
				<i>CV</i> 6,65	
			3355,3	93,8	
			3201,3	89,5	
	2,88		3229,7	90,3	
			3275,6	91,9	
			3882,7	91,7	
			3281,0	92,9	
			3573,2	92,9	
		<i>SD</i> 1,59			
		<i>CV</i> 1,74			
		12107,0	86,2		
		11806,5	84,0		
		12278,0	87,4		
		10793,5	76,8		
		12221,7	87,0		
		11970,2	85,2		
			<i>SD</i> 3,92		
			<i>CV</i> 4,65		
Średni współczynnik odzysku,		<i>Śr.</i> , %	94,7		
Odchylenie standardowe,		<i>SD</i>	8,8		
Współczynnik zmienności,		<i>CV</i> , %	9,3		

Badanie zakresu stosowania i precyzji metody analitycznej

W celu określenia zakresu roboczego metody przygotowano trzy serie po siedem filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 20 µl roztworów wzorcowych o stężeniach: 0; 3,6; 7,2; 14,4; 36; 72 i 144 µg/ml, co odpowiada zawartości: 0; 0,072; 0,144; 0,288; 0,72; 1,44 i 2,88 µg etopozydu na filtrze. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w wialach o pojemności 4 ml, zalano 2 ml mieszaniny metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego, a następnie poddano ekstrakcji za pomocą wytrząsarki rotacyjnej 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 w tabeli 3. oraz graficznie na rysunku 2.

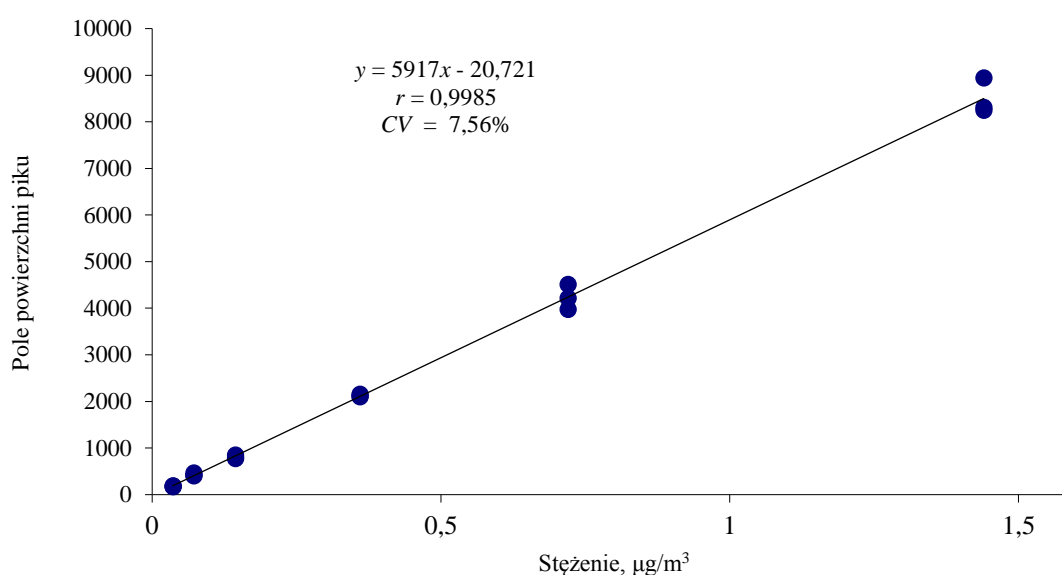
Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi detektora od stężenia etopozydu ma charakter liniowy w zakresie 0,036 ÷ 1,44 µg/ml. Podany zakres dla próbki powietrza 720 l odpowiada stężeniom 0,0001 ÷ 0,004 mg/m³. Zależność odpowiedzi detektora od analizowanych stężeń etopozydu opisuje równanie $y = 5916,967x - 20,721$. Wyrażony w procentach błąd względny *CV* wynosi 7,6, a współczynnik korelacji wynosi „*r*” – 0,9985.

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia, przygotowano trzy roztwory wzorcowe etopozydu o stężeniach: 0,072; 0,36 i 1,44 µg/ml. Roztwory oznaczano chromatograficznie, analizując każdy wzorzec dziesięciokrotnie.

Wyniki badania precyzji metody przedstawiono w tabeli 4. Współczynniki zmienności (*CV*) rozrzuć uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 0,072; 0,36 i 1,44 µg/ml wynoszą odpowiednio: 7,79; 3,96 i 3,02%.

Tabela 3.
Wyniki wzorcowania etopozydu na filtrach z włókna szklanego

Stężenie, µg/ml	0,036	0,072	0,144	0,36	0,72	1,44
Pole powierzchni pików	905,4 802,4 192,5	466,3 402,9 418,4	847,6 773,5 794,5	2158,5 2122,3 2102,6	4511,4 4217,3 3978,8	8941,3 8245,5 8309,1
Średnia wartość absorbancji	180,8	429,2	805,2	2127,9	4235,8	8498,6
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>	11,6	33,0	38,2	28,3	266,8	384,7
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %	6,4	7,7	4,7	1,3	6,3	4,5



Rys. 2. Krzywa wzorcowa etopozydu na filtrach z włókna szklanego

Tabela 4.
Wyniki badania precyzji metody oznaczania etopozydu

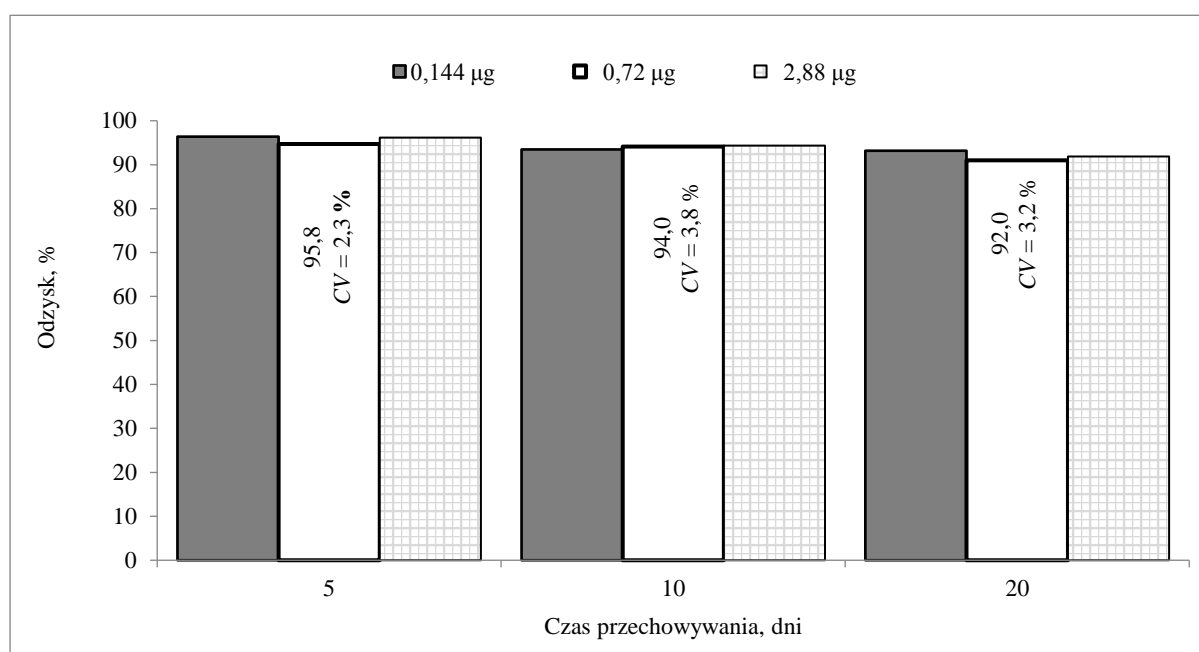
Numer analizy	0,072 µg/ml	0,36 µg/ml	1,44 µg/ml
1	433,0	2286,4	7782,9
2	547,3	2268,4	7811,5
3	417,3	2437,6	7940,9
4	430,6	2491,3	8082,6
4	480,3	2450,4	8071,2
6	475,6	2551,0	8489,8
7	478,9	2481,7	8532,5
8	504,4	2601,0	8461,2
9	511,0	2601,9	8048,8
10	461,8	2671,7	8246,3
Średnia	465,0	2485,9	8146,8
<i>SD</i>	31,2	128,5	275,2
<i>CV</i> , %	6,7	5,2	3,4

Badanie warunków przechowywania pobranych próbek

W celu zbadania trwałości etopozydu pobranego na filtry z włókna szklanego przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 20 μl roztworów wzorcowych o stężeniach: 7,2; 36 i 144 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczano w hermetycznych pojemnikach i przechowywano w chłodziarce przez okres: 5; 10 i 20 dni. W dniu badania filtry ekstrahowano 2 ml mieszaniny metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego przez 30 min za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,45 μm , a na-

stępnie poddano analizie chromatograficznej. Użyte wartości pól powierzchni pików etopozydu porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów przygotowanych w dniu badania.

Wyniki badań warunków przechowywania próbek przedstawiono na rysunku 3. Z zebranych danych wynika, iż próbki etopozydu pobrane na filtry, umieszczone w hermetycznych pojemnikach, przechowywane w chłodziarce, są trwałe przez co najmniej 20 dni. Po tym okresie przechowywania próbek współczynniki odzysku etopozydu z filtrów dla zawartości: 7,2; 36 i 144 $\mu\text{g}/\text{filtr}$ wynosiły odpowiednio: 93,2; 91,0 i 91,8% (średnia 92,0% $SD = 3,2$).



Rys. 3. Wpływ czasu i warunków przechowywania próbek powietrza do oznaczeń etopozydu

WALIDACJA

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

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,0001 ÷ 0,004 mg/m^3 (dla próbki powietrza 720 l)

- granica oznaczalności, X_{ozn} 0,0086 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- granica wykrywalności, X_{gw} 0,0026 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- współczynniki korelacji charakteryzujące liniowość krzywych wzorcowych $r = 0,9998$
- całkowita precyzja badania, V_c 9,8%
- niepewność całkowita metody 11,8%.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano metodę oznaczania etopozydu we frakcji wdychalnej w powietrzu środowiska pracy z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas. Zastosowanie kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 o wymiarach $150 \times 3,0$ mm, o uziarnieniu $5 \mu\text{m}$, eluowanej mieszaniną metanolu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego pozwala na oznaczenie tego związku

w obecności innych substancji. Opisana metoda umożliwia oznaczanie stężeń etopozydu powietrza środowiska pracy w zakresie $0,0001 \div 0,004 \text{ mg/m}^3$, tj. od około 1/20 do 2 wartości proponowanego 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

- Akhtar N., Talegaonkar S., Khar R.K., Jaggi M.A. (2013). Validated stability-indicating LC method for estimation of etoposide in bulk and optimized self-nano emulsifying formulation: Kinetics and stability effects. *Saudi Pharm. J.* 21(1), 103–111.
- Chen C. L., Uckun F.M. (2000). Highly sensitive liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of etoposide levels in human serum and plasma. *J. Chromatogr. B., Biomed. Sci. Appl.* 7, 744(1), 91–98.
- Dhanaraju M.D., Sundar V.D., Vijayalakshmi R., Naveena V.S.H. (2013). Estimation and Validation of Etoposide by RP-HPLC Method in Rat Plasma by Liquid-Liquid Extraction. *AJPCT* 1(2), 201–207.
- ECHA, European Chemical Agency (2017). Etoposide [<https://echa.europa.eu/pl/substance-information/substanceinfo/100.046.812>].
- Fabrizi G., Fioretti M., Mainero R.L. (2016). Dispersive solid-phase extraction procedure coupled to UPLC-ESI-MS/MS analysis for the simultaneous determination of thirteen cytotoxic drugs in human urine. *Biomed. Chromatogr.* 30(8), 1297–1308.
- Fleming R.A., Stewart C.F. (1991). High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Etoposide in Plasma. *J. Liq. Chromatogr.* 14, 1275–1283.
- 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.
- Hayat M.M., Ashraf M., Rehman N., Nasim F., Ahmad I., Rahman J., Saleem M., Malik M.Z. (2011). HPLC Determination of Etoposide in Injectable Dosage Forms. *J. Chil. Chem. Soc.* 56(4), 881–883.
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2005). Etoposide [<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~RaXrjr:3>].
- IARC, International Agency for Research for Cancer (2000). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Antiviral and Antineoplastic Drugs, and Other Pharmaceutical Agents. Volume 76 [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol76/index.php>].
- IARC, International Agency for Research for Cancer (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals. Volume 100A [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/index.php>].
- Negreira N., Mastroianni N., López de Alda M., Barceló D. (2013). Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography – electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta* 116, 290–299.
- PN-EN-482+A1:2016-01 Powietrze na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.
- PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.
- 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 (zwane rozporządzeniem GHS). *Dz. Urz. UE L* 353 z 31.12.2008.
- Soćko R. (2017). Etopozyd – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy [praca złożona do druku, nieopublikowana.]

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA ETOPOZYDU – FRAKCJI WDYCHALNEJ W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania stężeń frakcji wdychalnej etopozydu w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie etopozydu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,0001 mg/m³.

2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7 (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

Metoda polega na: zatrzymaniu frakcji wdychalnej obecnego w powietrzu etopozydu na filtrze z włókna szklanego, wymyciu zatrzymanego związku mieszaniną metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego za pomocą wytrząsarki rotacyjnej, 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. Etopozyd

Stosować wg punktu 4.

5.2. Kwas mrówkowy

Stosować wg punktu 4.

5.3. Metanol

Stosować metanol o czystości do HPLC – MS.

5.4. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC – MS.

6. Roztwory

6.1. Roztwór ekstrakcyjny

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

6.2. Roztwór wzorcowy podstawowy etopozydu

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważyć na wadze analitycznej (wg punktu 7.9.) około 2 mg wzorca etopozydu (wg punktu 5.1.). Wzorzec rozpuścić w roztworze ekstrakcyjnym wg punktu 6.1. Po rozpuszczeniu wzorca kolbę uzupełnić do kreski i obliczyć zawartość etopozydu w jednym mililitrze roztworu.

6.3. Roztwór wzorcowy pośredni etopozydu

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml odmierzyć za pomocą pipety (wg punktu 7.7.) taką ilość wzorca podstawowego, aby otrzymać stężenie 144 µg/ml.

6.4. Roztwory wzorcowe robocze

Do siedmiu kolb miarowych o pojemności 2 ml (wg punktu 7.4.) odmierzyć za pomocą pipety

(wg punktu 7.7.) odpowiednio: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 i 2 ml roztworu pośredniego, kolby uzupełnić do kreski roztworem ekstrakcyjnym (wg punktu 6.1.). Stężenia w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 3,6; 7,2; 14,4; 36; 72 i 144 µg/ml.

7. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

7.1. Chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas

Stosować chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas.

7.2. Filtry szklane

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 25 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: 2; 5 i 10 ml.

7.5. Kolumna chromatograficzna

Stosować chromatograficzną kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 150 mm x 3 mm, o uziarnieniu 5 µm.

7.6. Naczynka szklane (wiale)

Stosować wiale o pojemności 2 i 4 ml.

7.7. Pipety automatyczne nastawne

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

7.8. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości około 2 l/min wraz z głowicą typu IOM do pobierania frakcji wdychalnej.

7.9. Waga analityczna

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

7.10. Wytrząsarka rotacyjna

Stosować wytrząsarkę rotacyjną.

8. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-7:2002. Za pomocą pompy (wg punktu 7.8.) przepuścić przez filtr szklany, umieszczony w głowicy do pobierania frakcji wdychalnej zgodnie z instrukcją producenta (wg punktu 7.2.), około 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać

w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe przez co najmniej 20 dni.

9. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej oraz parametry pracy spektrometru mas, aby zapewnić selektywne oznaczanie etopozydu od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 7.5. oznaczanie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako przykładowe.

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na siedem filtrów (wg punktu 7.2.) nanieść za pomocą pipety automatycznej (wg punktu 7.7.) po 20 µl roztworów wzorcowych roboczych (wg punktu 6.4.). Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml (wg punktu 7.6.). Do każdej wiali dodać po 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 6.1.) i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki rotacyjnej (wg punktu 7.10.). Masa etopozydu w roztworach uzyskanych po ekstrakcji filtrów wynosi odpowiednio: 0; 0,072; 0,144; 0,288; 0,72; 1,44 i 2,88 µg. Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe (wg punktu 7.3.) i poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych masę wzorca naniesionego na filtr, a na osi rzędnych wartość pola powierzchni (wysokości) piku 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, zalać 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 6.1.) i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki rotacyjnej (wg punktu 7.10.). Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml, przepuszczając je przez filtry strzykawkowe (wg punktu 7.3.), następnie wiale szczelnie zamknąć 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.

Tabela 1.
Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem mas

Kolumna analityczna	Supelcosil™ LC-18 150 x 3 mm x 5 μm																																				
Faza ruchoma (izokratycznie)	metanol z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego: woda z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego, 70: 30																																				
Warunki pracy spektrometru Fragmentacja jonów: tryb MRM (ang. <i>multiple reaction monitoring</i>) CP: 589,5→229,5	<table> <tr><td>jonizacja</td><td>ES +</td></tr> <tr><td>napięcie kapilary</td><td>3,0 kV</td></tr> <tr><td>napięcie źródła jonów</td><td>27 V</td></tr> <tr><td>napięcie ekstraktora</td><td>2 V</td></tr> <tr><td>napięcie soczewek RF</td><td>0,1 V</td></tr> <tr><td>temperatura źródła jonów</td><td>110 °C</td></tr> <tr><td>temperatura desolwacji</td><td>350 °C</td></tr> <tr><td>przepływ azotu w źródle jonów</td><td>1 l/h</td></tr> <tr><td>przepływ azotu desolwacji</td><td>600 l/h</td></tr> <tr><td>rozdzielczość LM/HM 1</td><td>13/12</td></tr> <tr><td>energia jonów 1</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>komora kolizyjna:</td><td></td></tr> <tr><td>– energia wejścia</td><td>1</td></tr> <tr><td>– energia kolizji</td><td>22</td></tr> <tr><td>– energia wyjścia</td><td>1</td></tr> <tr><td>rozkład LM/HM 2</td><td>13/12</td></tr> <tr><td>energia jonów 2</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>ciśnienie gazu kolizyjnego</td><td>3,5 · 10⁻³ mbar</td></tr> </table>	jonizacja	ES +	napięcie kapilary	3,0 kV	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 · 10 ⁻³ mbar
jonizacja	ES +																																				
napięcie kapilary	3,0 kV																																				
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 · 10 ⁻³ mbar																																				
Strumień objętości	0,3 ml/min																																				
Temperatura kolumny	40°C																																				
Objętość próbki	10 μl																																				

12. Obliczanie wyniku oznaczania

w którym:

Stężenie etopozydu (X) w badanym powietrzu obliczyć w mg/m³ na podstawie wzoru:

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

- c – zawartość etopozydu odczytana z krzywej wzorcowej, w mg,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w m³.