

Docetaksel

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

Docetaxel

Determination in workplace air with high performance liquid chromatography

dr hab. MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA, prof. nadzw. CIOP-PIB
e-mail: mapol@ciop.pl
dr MAŁGORZATA POŚNIAK
e-mail: mapos@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS: 114977-28-5

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

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

Streszczenie

Docetaksel (DCT) to cytostatyk pochodzenia roślinnego z grupy taksoidów – inhibitorów mitozy. Docetaksel jest cytostatykiem stosowanym w leczeniu raka: piersi, płuc, gruczołu krokowego, płaskonabłonkowego głowy i szyi oraz gruczolaka żołądka. Ze względu na zagrożenia dla zdrowia docetaksel został zaklasyfikowany jako substancja mutagenna kategorii zagrożenia 2., działająca szkodliwie na rozrodczość kategorii zagrożenia 1.B oraz wysoce łatwopalna ciecz.

W artykule przedstawiono metodę oznaczania docetakselu w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowa-

niem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem diodowym (DAD). Metoda polega na: wyodrębnieniu frakcji wdychalnej aerozolu docetakselu z powietrza na filtrze z włókna szklanego, wymyciu analitu wodą destyloowaną oraz analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu. Oznaczenia prowadzono w układzie faz odwróconych – faza ruchoma: acetonitryl; roztwór octanu amonu (o pH = 4,5) z zastosowaniem kolumny analitycznej C18 wypełnionej modyfikowanym żelem krzemionkowym.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono zakres pomiarowy metody $0,6 \div 10,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$

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 (numer zadania badawczego 3.Z.17.).

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

dla próbki powietrza o objętości 960 l. Granica wykrywalności (LOD) tej metody wynosi 0,0065 µg/ml, a granica oznaczalności (LOQ) – 0,0195 µg/ml.

Opracowaną metodę oznaczania docetakselu w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku.

Summary

Docetaxel (DCT) is a plant derived cytotoxic from taxane family – mitosis inhibitors. It is used in the treatment of breast, lung and prostate cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck, and gastric adenoma. Docetaxel is a highly flammable liquid and health-threatening substance classified as mutagenicity category 2 and reproductive toxicity category 1B.

This paper presents a method for measuring docetaxel in the workplace air with HPLC with diode array detector (DAD). The method is based on the adsorption

of inhalable fraction of docetaxel aerosol on glass fiber filter, desorption with water and chromatographic analysis. The analysis was performed in reverse phase on C₁₈ column and mobile phase – acetonitrile: ammonium acetate solution (45: 55). The measurement range was 0.6 – 10 µg/m³ for 480-L air sample. The limit of detection (LOD) was 0.0065 µg/ml and the limit of quantification (LOQ) was 0.0195 µg/ml.

The developed method of docetaxel determination has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

WPROWADZENIE

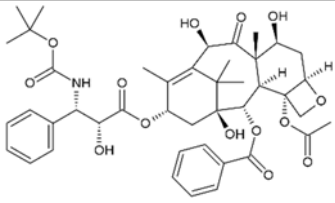
Docetaksel (DCT) to cytostatyk pochodzenia roślinnego z grupy taksoidów – inhibitorów mitozy. Wspólną cechą tej grupy leków jest działanie hamujące proces prawidłowego podziału komórkowego. Są to leki powodujące stabilizację wrzeciona mitotycznego i zahamowanie podziału lub destabilizację oraz zniszczenie struktur umożliwiających podział (Walusiak-Skorupa i in. 2009). Na podstawie wyników badań ankietowych przeprowadzonych w oddziałach onkologicznych i aptekach krajowych szpitali wykazano, że 14% respondentów ma kontakt z docetaksem podczas pracy (Krzemińska S. i in.

2016). Ze względu na zagrożenia dla zdrowia docetaksel został zaklasyfikowany jako substancja mutagenna kategorii zagrożenia 2., działająca szkodliwie na rozrodczość kategorii zagrożenia 1.B oraz wysoce łatwopalna ciecz.

Cytostatyk ten jest stosowany w leczeniu raka: piersi, płuc, gruczołu krokowego, płaskonabłonkowego głowy i szyi oraz gruczolaka żołądka.

Podstawowe właściwości fizykochemiczne, toksyczne oraz farmakologiczne docetakselu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.
Podstawowe właściwości docetakselu (DCT), (Indeks... 2005)

Docetaksel	
Wzór strukturalny	
Nazewnictwo	
Nomenklatura systematyczna (IUPAC); ester (2aR,4S,4aS,6R,9S,11S,12S,12aR,12bS)-12b-(acetyloksy)-12-(benzoioksy)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodekahydro-4,6,11-trihydroksy-4a,8,13,13-tetrametylo-5-okso-7,11-metano-1H-cyklodeka[3,4]benz[1,2-b]okset-9-ylowy kwasu β-(((1,1-dimetyloetoksy)karbonylo)amino)-α-hydroksy-benzenopropionowego	
Informacje ogólne	
Wzór sumaryczny	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄
Masa molowa	807,88 g/mol

cd. tab. 1.

Docetaksel	
Wygląd	biały proszek
Identyfikacja	
Numer CAS PubChem DrugBank	114977-28-5 148124 DB01248
Właściwości fizykochemiczne	
Rozpuszczalność w wodzie Temperatura topnienia logP	60 mg/l 232 °C 2,4
Niebezpieczeństwo	
MSDS (Safety... 2016)	H225 – wysoce łatwopalna ciecz i para H319 – działa drażniąco na oczy H341 – podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne H360D – może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki H362 – może działać szkodliwie na dzieci karmione piersią
Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów	
Substancja nie jest klasyfikowana jako niebezpieczna według kryteriów systemu GHS	
Europejska klasyfikacja substancji	
Substancja nie jest klasyfikowana jako niebezpieczna według europejskich kryteriów	
Numer RTECS Dawka śmiertelna Jeżeli nie podano inaczej, dane dotyczą stanu standardowego (25 °C; 1000 hPa) Stosowanie w ciąży	DA4172750 LD ₅₀ 2,5 mg/kg (pies, dożylnie) kategoria D
Farmakokinetyka	
Działanie Okres półtrwania Wiązanie z białkami osocza i tkanek Metabolizm Wydalenie	przeciwnowotworowe, przeciwzimmiczne 11,1 h ok. 94% wątrobowy z moczem i kałem
Uwagi terapeutyczne	
Droga podawania Objętość dystrybucji	dożylnie 113 l

Docetaksel to lek przeciwnowotworowy stosowany w chemioterapii nowotworów. Związek jest otrzymywany z igieł cisu pospolitego (ang. *taxus baccata*). Działa przeciwnowotworowo przez łączenie białka tubuliny w trwałe mikrotubule oraz hamowanie ich rozpadu, a także zatrzymywanie komórki na granicy meta- i anafazy, co prowadzi do śmierci komórki. Do najczęstszych działań niepożądanych zaliczamy: zahamowanie czynności szpiku kostnego, zmiany w obrazie krwi, zaburzenia rytmu serca, skórne reakcje alergiczne, zaburzenia czynności wątroby oraz dróg żółciowych (Farmakologia... 2005).

Zawodowymi grupami narażonymi na działanie tego leku są przede wszystkim: pielęgniarki, lekarze, farmaceuci zatrudnieni na oddziałach onkologicznych

oraz weterynarze. Również pracownicy laboratoriów medycznych, technicy medyczni, a także członkowie ekip sprzątających oraz pracownicy kuchni i pralni przyszpitalnych mogą mieć kontakt z tymi substancjami chemicznymi stwarzającymi zagrożenie.

Podobnie jak w przypadku innych cytostatyków metody oznaczania docetakselu dotyczą przede wszystkim materiału biologicznego i bazują na wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stosując kolumnę Lichrocat (*Brigagão da Silva* 2016), fazę ruchomą 20 mmol/L diwodorofosforanu potasu i acetonitrylu (55: 45 V/V) o przepływie 1 ml/ml i detektor UV, długość fali analitycznej 230 nm oznaczano docetaksem na poziomie 20 ng/ml. Zastosowanie metody chromatografii cieczowej

z tandemowym spektrometrem mas (LC/MS/MS) umożliwia selektywne oznaczanie cytotatyków z grupy taksoidów na małych poziomach stężeń – 0,1 ng/ml (Jones 2004). Docetaksel oznaczano w stałych nanocząstkach lipidów, wykorzystując również technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną HPLC/UV (Venishetty 2011) oraz kolumnę C18. Jako fazę ruchomą stosowano acetonitryl z dodatkiem 0,2% trietyloaminy. Docetaksel po ekstrakcji eterem dietylowym oznaczano w płazmie, stosując: kolumnę Nucleosil 5, fazę ruchomą – acetonitryl: bufor octanowy: tetrahydrofuran (45: 50: 5 v/v) oraz detektor UV przy długości fali analitycznej 227 nm. Oznaczalność metody wynosiła 25 ng/ml (Ciccolini i in. 2001).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji dotyczących wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) w powietrzu na stanowiskach pracy. Jeden z producentów docetakselu proponuje zakres wartości narażenia zawodowego (OEL) w zakresie od $1 \div < 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie frakcji wdychalnej aerozolu docetakselu w powietrzu środowiska pracy na poziomie około $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, tj. około 1/10 wartości środkowej proponowanego zakresu dopuszczalnego stężenia dla tego cytotatyku.

Metoda badań

Do oznaczania docetakselu w powietrzu na stanowiskach pracy zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną (DAD), podczas badań nad: ustaleniem parametrów

wyodrębniania substancji z powietrza, przygotowaniem pobranej próbki powietrza do analizy i ilościowym oznaczaniu badanej substancji.

Aparatura

W badaniach zastosowano: chromatograf cieczowy firmy Elite LaChrom Merck – Hitachi, detektor DAD L-2450 z automatycznym podajnikiem próbek L2200 oraz kolumnę analityczną C18 wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym (ang. *endcapend phurosphere star* RP-18) o wymiarach 250 x 4,6 mm i uziarnieniu 5 μm z przedkolumną (firmy Merck, Niemcy). Do pobierania i przygotowania próbek powietrza do badań stosowano: aspirator Gilian 3500 (SKC Inc., USA), próbnik do wyodrębniania cząstek aerozolu zgodnie z wymaganiami dla frakcji wdychalnej, typ I.O.M. (firmy Anglia), wytrząsarkę mechaniczną WL-2000 (JWElectronic, Polska), wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA).

Odczynniki i materiały

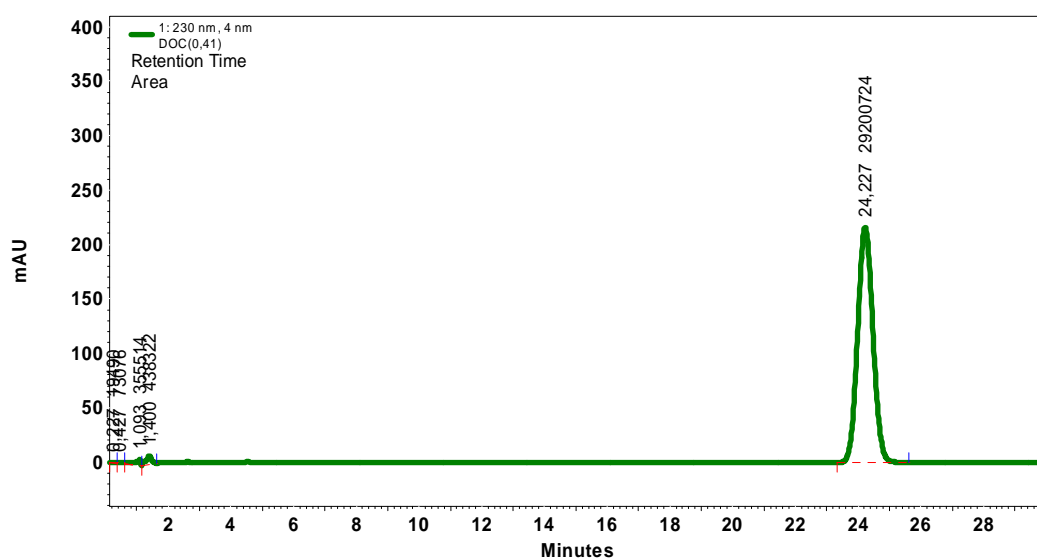
W badaniach wykorzystano: docetaxel 100 mg – European Pharmacopea Referency Standard (firmy Teva Pharmaceutical Polska), octan amonu, wodorofosforan sodu, kwas fosforowy cz.d.a. (firmy POCH S.A., Polska), acetonitryl o czystości do HPLC (firmy Merck, Niemcy), wodę wysokiej czystości uzyskaną z aparatu Milli-Q (Millipore, USA), filtry z włókna szklanego o średnicy 25 mm (firmy SKC, USA) oraz szkło laboratoryjne: kolby pomiarowe, kolby stożkowe 25 ml, pipety, strzykawki do cieczy i inne.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Ustalenie warunków oznaczania chromatograficznego

Do oznaczania docetakselu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją diodową i kolumnę analityczną C18 wypełnioną modyfikowanym żelem krzemionkowym (ang. *endcapend phurosphere star* RP-18).

Do elucji zastosowano mieszaninę acetonitryl: 0,01M fosforan amonu (45: 55 v/v) o pH = 6,2 z dodatkiem kwasu fosforowego (Mistran i in. 2010). Stosując przepływ 1,5 ml/min i prowadząc pomiar przy długości fali detektora $\lambda = 230 \text{ nm}$ otrzymano pik w czasie retencji 24,2 min (rys. 1.).



Rys. 1. Chromatogram roztworu wzorcowego docetakselu (DCT) o stężeniu 0,4 µg/ml, objętość nastrzyku 20 µl

Zastępując fosforan amonu (w fazie pierwszej) octanem amonu i zmniejszając pH fazy do 4,5 przy tej samej prędkości przepływu i detekcji, uzyskano pik w czasie retencji – 13,7 min (Naresh i in. 2010).

Ze względu na krótszy czas analizy, do chromatograficznego rozdzielania zastosowano eluent będący

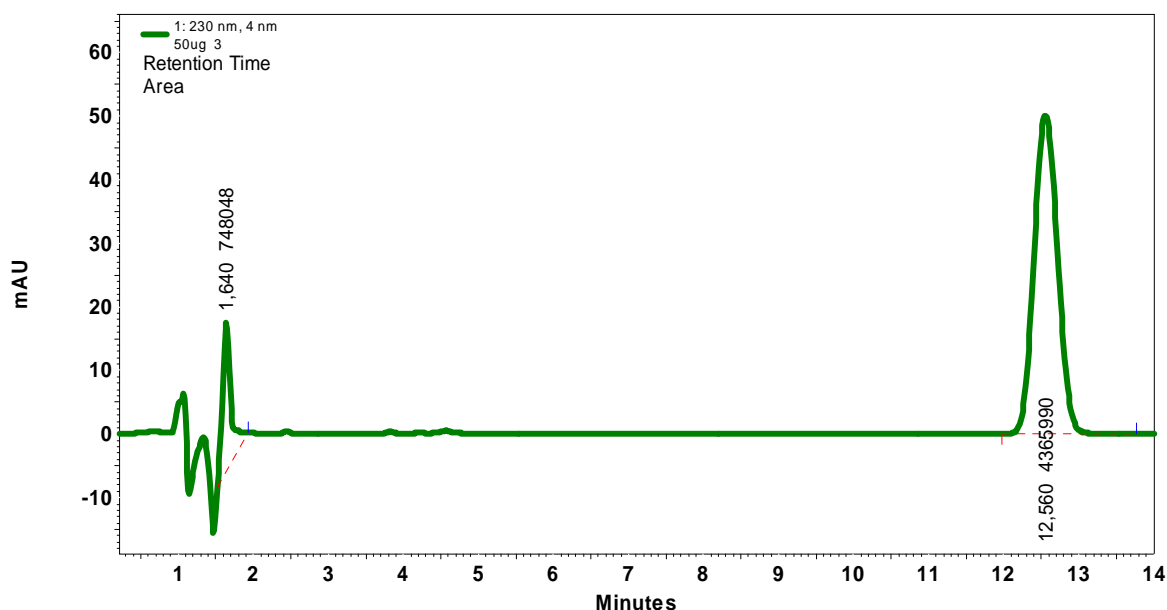
mieszaniną acetonitrylu – octanu amonu. Warunki oznaczania chromatograficznego związku zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2.
Warunki oznaczania chromatograficznego docetakselu (DCT)

Parametry badane	Ustalony warunki
Kolumna	250 x 4,6 mm, 5µm
Temperatura kolumny	25 °C
Faza ruchoma	acetonitryl: roztwór 0,02(mol)/L octan amonu z dodatkiem kwasu ortofosforowego, pH = 4,5 (45: 55)
Przepływ objętości	1,5 ml/min
Detektor	UV-VIS
Długość fali	230 nm
Objętość pętli	20 µl

Najmniejsza ilość docetakselu oznaczana w wyżej wymienionych warunkach wynosiła 0,2 µg/ml.

Chromatogram roztworu wzorcowego przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Chromatogram roztworu wzorcowego docetakselu (DCT) o stężeniu 0,5µg/ml

Badanie wymywania i zatrzymywania docetakselu na filtrach

Docetaksel (DCT) jest emitowany do powietrza stanowisk pracy w postaci aerozolu cząstek stałych w procesie produkcji leku, natomiast podczas przygotowywania i stosowania roztworów w chemioterapii – w postaci cząstek aerozolu ciekłego. 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 z zastosowaniem próbników umożliwiających pobranie z powietrza docetakselu zgodnie z wymaganiami konwencji frakcji wdychalnej (PN-EN 481: 1998).

Do badań zastosowano filtry z włókna szklanego, powszechnie stosowane podczas pobierania próbek powietrza zawierającego aerozole substancji organicznych oraz wodę destylowaną do wymywania substancji z filtrów.

Przeprowadzono badania stopnia odzysku docetakselu z filtrów. W pięciu kolbach stożkowych Erlenmayera umieszczono filtry z włókna szklanego

i naniesiono 50 µl roztworu docetakselu o stężeniu 200,0 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 0,92.

Badania wyodrębniania docetakselu z powietrza przeprowadzono w następujący sposób. Dwa filtry z włókna szklanego umieszczono w oprawce do próbnika I.O.M. Na pierwszy filtr naniesiono 50 µl roztworu docetakselu w wodzie destylowanej o stężeniu 200,0 µg/ml, a na drugi filtr nie nanoszono badanej substancji i przepuszczano 960 l powietrza ze strumieniem objętości 2 l/min. Kolejne zestawy przygotowano analogicznie i przepuszczono 960 l powietrza z takim samym strumieniem objętości. Analit wymywano z filtrów 3 ml wody destylowanej. Na podstawie wyników badań przedstawionych w tabeli 3. wykazano, że docetaksel 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 docetakselu (DCT) z filtrów z włókna szklanego. Kolumna C18, faza ruchoma: acetonitryl: 0,02 (mol)/L bufor amonowy (45: 55)

Strumień objętości pochłanianego powietrza, l/min	Czas pochłaniania, min	Przybliżone stężenie DCT w powietrzu, $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Średnie pole powierzchni pików pochodnej DCT w roztworach po wymyciu, wg wskazań integratora	
			I filtr	II filtr
2,0	480	10	469082	n.w.
			473072	n.w.
			460055	n.w.
			469200	n.w.
			478083	n.w.

Objaśnienia: n.w. – nie wykryto.

Uzyskane wyniki wskazują, że filtr z włókna szklanego zapewnia ilościowe wyodrębnienie docetakselu z badanego powietrza przy pobieraniu próbki o objętości 960 l, a woda destylowana jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do wymywania tej substancji z filtrów.

Kalibracja

Zakres pomiarowy metody oznaczania docetakselu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową został ustalony na poziomie $0,2 \div 12 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Przygotowano trzy serie roztworów kalibracyjnych o stężeniach: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 i $12,8 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Do chromatografu wprowadzono za pomocą pipety dozowniczej po 20 μl roztworów wzorcowych roboczych. Z każdego roztworu wzorcowego wykonywano dwukrotny pomiar, odczytywano powierzchnie pików i obliczano średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż $\pm 5\%$ tej wartości. Następnie wykreślano krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość docetakselu w 1 ml roztworów wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików. Wyniki kalibracji przedstawiono w tabeli 4., a wykres krzywej kalibracji na rysunku 3.

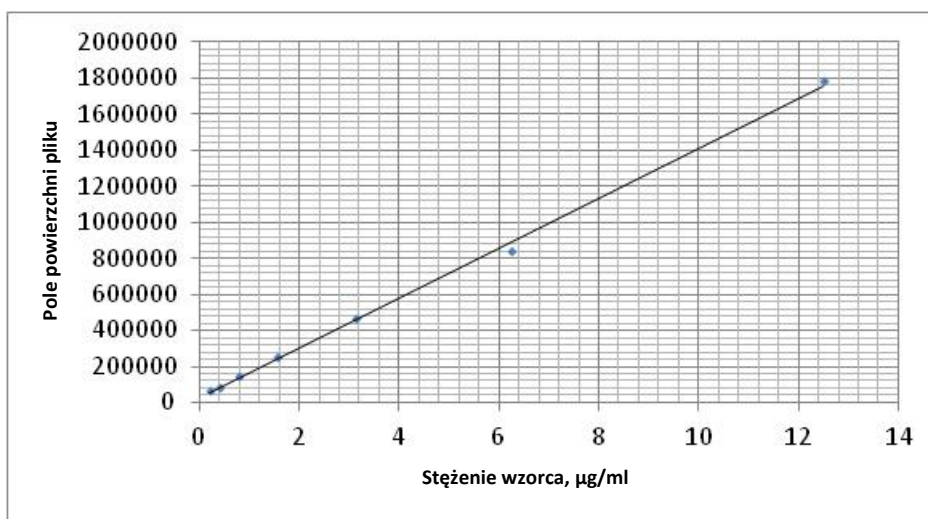
Tabela 4.

Wyniki kalibracji docetakselu (DCT)

Stężenie, x , $\mu\text{g}/\text{ml}$	Średnia powierzchnia pików, y_{sr} wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III	Odchylenie standardowe, S	Współczynnik zmienności, V , %	Współczynnik kalibracji, B $f(c) = y/x$
	I seria	II seria	III seria				
12,5	1785682	1768923	1789202	1781269	10 835,84	0,61	142501,52
6,25	844990	837654	835113	839252	5 128,82	0,61	134280,37
3,13	469082	467498	462794	466458	3 270,46	0,7	149028,12
1,56	250311	236845	251872	246343	8 262,17	3,35	157911,97
0,78	141326	142953	145006	143095	1 844,10	1,29	183455,13
0,39	73756	77953	77642	76450	2 338,54	3,06	196026,49
0,2	60031	60612	60612	60418	335,44	0,56	302091,65

cd. tab. 4.

Stężenie, x , $\mu\text{g/ml}$	Średnia powierzchnia pików, y_{sr} wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III	Odchylenie standar- dowe, S	Współczynnik zmienności, V , %	Współczynnik kalibracji, B $f(c) = y/x$
	I seria	II seria	III seria				
Krzywa kalibracji $Y = Bx + A$	$y =$ 139218,46x + 24452,57	$y =$ 137871,06x + 24551	$y =$ 139051,81x + 24623,64	$y =$ 138713,78x + 24542,4			
Współczynnik korelacji, R	0,9993	0,9993	0,999	0,9992			
Średnia wartość współczynnika kalibracji					210 882,54		
Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji, S_b					57 900,36		
Współczynnik zmienności współczynnika kalibracji, n_{kal} , %					27,46		



Rys. 3. Wykres krzywej kalibracji docetakselu (DCT)

W badanym zakresie stężeń uzyskano liniowy przebieg krzywej wzorcowej ze współczynnikiem korelacji 0,9993.

Badanie precyzji

W celu wyznaczenia precyzji etapu analitycznego, z niezależnych roztworów podstawowych przygotowano trzy serie pomiarowe o stężeniach odpowiednio: 0,2, 1,6 i 12,5 $\mu\text{g/ml}$, po cztery roztwory wzorcowe każda. Następnie każdy z roztworów poddano analizie chromatograficznej.

Na podstawie odczytanych powierzchni pików obliczono odchylenie standardowe (S) i współczynnik zmienności dla danego poziomu stężeń (v). Następnie wyznaczono średnią precyzję wyrażoną jako średni współczynnik zmienności dla zakresu stężeń.

Średnia precyzja oznaczania wyniosła 5,00. Wyniki badania precyzji oznaczania docetakselu zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5.
Wyniki badania precyzji oznaczania docetakselu (DCT)

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 0,2 µg/ml		II seria – roztwór o stężeniu 1,6 µg/ml		III seria – roztwór o stężeniu 12,5 µg/ml	
68327	64 469,50	250311	250 695	1785682	1 787 410,00
60612		251079		1789138	
60735	60 796,50	250311	250 695	1792594	1 792 822,00
60858		251079		1793050	
61081	61 142,50	251247	251 586	1798506	1 796 778,00
61204		251925		1795050	
61627	61 688,50	252293	252 677	1796506	1 794 778,00
61750		253061		1793050	
Średnia powierzchnia pików	62 024,25	średnia powierzchnia pików	251 413	średnia powierzchnia pików	1 792 947,00
Odchylenie standardowe, <i>S</i>	2 578,40	odchylenie standardowe, <i>S</i>	958,56	odchylenie standardowe, <i>S</i>	4 060,72
Współczynnik zmienności, <i>n₃</i> , %	4,16	współczynnik zmienności, <i>n₁</i> , %	0,38	współczynnik zmienności, <i>n₂</i> , %	0,23
Średnia precyzja		średni współczynnik zmienności dla zakresu, <i>n_{zakresu}</i> , %		0,2565	
Całkowita precyzja badania – średni współczynnik zmienności, <i>n_c</i> , %				5,0066	

Granice wykrywalności (LOD) obliczono 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 trzech serii próbek ślepych (zerowych) przeprowadzono dziewięć niezależnych pomiarów powierzchni piku przy czasie retencji docetakselu (11,5 min) dla próbki

przygotowanej w identyczny sposób jak próbka rzeczywista, bez analitu. Granica oznaczalności (LOQ) jest wielokrotnością wyznaczonej wartości granicy wykrywalności (LOD). Wyniki pomiarów dla ślepej próby pozwoliły na uzyskanie granicy wykrywalności na poziomie 0,0065 $\mu\text{g/ml}$ i granicy oznaczalności – 0,0195 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki przedstawiono w tabeli 6., a wyniki wyznaczonych wartości niepewności w tabeli 7.

Tabela 6.
Granica oznaczalności i wykrywalności docetakselu (DCT)

	Ślepe próby		
	odpowiedź detektora wg wskazań analitycznej stacji komputerowej, powierzchnia piku chromatograficznego o czasie retencji – 11,5 min		
	1	2	3
Wyznaczone parametry	7 492	2 554	4 170
	6 764	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
	4 742	2 681	4 742
Odchylenie standardowe dla jednej serii próbek	514,77	89,80	404,47
Odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych, S_0	336,35		
Równanie krzywej kalibracji: $y = Bx + A$	$y = 171\,768,8x + 57\,672,87$		
Współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji, B	171 768,8		
Granica wykrywalności, LOD	0,0065		
Granica oznaczalności, LOQ	0,0195		

Tabela 7.
Niepewność całkowita i rozszerzona metody oznaczania docetakselu (DCT)

Oznaczany parametr	Wartość
Średnia wydajność współczynnika desorpcji/odzysku	0,92
Całkowita precyzja badania – średni współczynnik zmienności dla zakresu, V_c , %	5,00
Względna niepewność całkowita, U_T , %	10,93
Niepewność rozszerzona, U	21,87

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano selektywną metodę oznaczania docetakselu (DCT) 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 docetaksel wymywano wodą destylowaną. Do oznaczania pochodnej docetakselu zastosowano kolumnę analityczną C18 wypełnioną modyfikowanym żelem krzemionkowym, którą eluowano mieszaniną acetonitrylu i 0,02 (mol)/L octanu amo-

nowego o pH = 4,5 (45: 55), co umożliwia selektywne oznaczanie docetakselu w obecności innych substancji występujących w powietrzu na różnych etapach produkcji i stosowania leku.

Opracowana metoda oznaczania stężeń docetakselu może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy do wykonywania pomiarów stężeń tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia pracowników i oceny ryzyka zawodowego stwarzanego przez tę substancję. Wyniki tej oceny będą stanowiły podstawę do podejmowania odpowiednich działań profilaktycznych.

PIŚMIENNICTWO

- 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 Pharmaceutical and Toxicological Methods* 82, 68–73.
- Ciccolini J., Catalin J., Blachon M.F., Durand A.* (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic determination of docetaxel (Taxotere) in plasma using liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 15, 759(2), 299–306.
- Farmakologia Goodmana & Gilmana (2005). Leki przeciwnowotworowe. Rozdział 51. [Red.] L.L. Bruntona, J.S. Laza, K.L. Parkera. Warszawa.
- Indeks leków (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.
- Mistran A.F., Dzarr A.A., Gan S.H.* (2010). HPLC method development and validation for simultaneous detection of Arabinoside-C and doxorubicin. *Toxicology Mechanisms and Method* 20(8), 472–481.
- Naresh Kumar K., Appala Raju N., Raju S. S., Ramarao B., Mukkanti K.* (2010). Estimation of Docetaxel in Parenterals by RP-HPLC. *Asian Journal of Chemistry* 10(22), 7513–7518.
- Safety Data Sheet (2016). Pfizer [dostęp: 1.03.2016; https://www.pfizer.com/sites/default/files/products/material_safety_data/Docetaxel_Injection_1-March-2016.pdf].
- Walusiak-Skorupa J., Wągrowaska-Koski E., Pałczyński C.* (2009). Cytostatyki. Narażenie zawodowe. Skutki zdrowotne. Profilaktyka. Orzecznictwo. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.
- Venishetty V. K., Parikh N., Sistla R., Achmed F.J., Diwan P. V.* (2011). Application of Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Docetaxel and Ketoconazole in Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Chromatographic Science* 49, 136–141.
- PN-EN 481: 1998 Atmosfera miejsca pracy – Określenie składu ziarnowego dla pomiaru cząstek zawieszonych w powietrzu.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA DOCETAKSELU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości docetakselu (CAS 114977-28-5) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie docetakselu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi około $0,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ przy pobraniu 960 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 docetakselu 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 związane z: przygotowaniem roztworów wzorcowych, wyznaczeniem 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. Docetaksel

Stosować wzorzec wg Farmakopei Europejskiej.

4.3. Metanol

4.4. Kwas fosforowy

4.5. Octan amonu

Stosować roztwór o stężeniu 0,02(mol)/l.

4.6. Roztwór wzorcowy podstawowy docetakselu

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

4.7. Roztwór roboczy pośredni

Do kolby miarowej o objętości 10 ml odmierzyć 100 μl roztworu podstawowego docetakselu i uzupełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.8. Roztwory wzorcowe robocze

Do kolb miarowych o objętości 1 ml odmierzyć: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 i 0,64 ml roztworu pośredniego i dopełnić wodą do kreski. Zawartość docetakselu w tak przygotowanych wzorcach wynosi odpowiednio: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 i 6,4 μg .

4.9. Roztwór wzorcowy do wyznaczenia współczynnika odzysku

Do kolby miarowej o objętości 10 ml odmierzyć 1 ml roztworu podstawowego docetakselu i dopełnić do kreski wodą. Stężenie tak przygotowanego roztworu wynosi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.10. 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 oznaczenie pochodnej docetakselu 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. Wytrząsarka mechaniczna

Stosować wytrząsarkę 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 4.10. umieszczony w próbniku wg punktu 5.3., przepuścić do 960 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min lub innym (zgodnie z instrukcją próbника stosowanego do wyodrębniania frakcji wdychanej aerozolu).

Pobrane próbki, przechowywane w temperaturze ok. 20 $^{\circ}\text{C}$, zachowują trwałość przez 24 godziny.

7. Warunki pracy chromatografu

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

- faza ruchoma –
acetonitryl: 0,01 (mol)/L
bufor amonowy o pH = 4,5 45: 55
- natężenie przepływu
strumienia fazy ruchomej 1,5 ml/min
- temperatura kolumny pokojowa
- długość fali analitycznej
detektora diodowego 230 nm
- objętość dozowanej próbki 20 μl .

8. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Wprowadzić do chromatografu za pomocą pętli dozowniczej po 20 μl roztworów wzorcowych 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 docetakselu w roztworach wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

9. Wyznaczanie współczynnika odzysku

W pięciu kolbach wg punktu 5.5. umieścić filtry z włókna szklanego i następnie dodać po 50 μl roztworu do wyznaczania współczynnika odzysku wg punktu 4.9. 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. Oznaczenie badanej substancji wykonać wg punktu 10. Jednocześnie wykonać oznaczenie badanej substancji, co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 3 ml wody po 50 μl roztworu do wyznaczania współczynnika odzysku wg punktu 4.9.

Współczynnik odzysku docetakselu (d) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

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

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

P_p – średnia powierzchnia pików pochodnej docetakselu na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku docetakselu (\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. Następnie pobrać 20 μ l roztworu z nad filtra i badać chromatograficznie w warunkach określonych w punkcie 7. Wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików doce-

takselu według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość docetakselu w 1,0 ml badanego roztworu z nad filtra odczytać z wykresu krzywej wzorcowej, w mikrogramach.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie docetakselu (X) w badanym powietrzu obliczyć na podstawie wzoru, w miligramach na metr sześcienny:

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

w którym:

m – zawartość docetakselu w 1,0 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.