



Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas lub z detekcją fluorescencyjną do oznaczania chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu na stanowiskach pracy¹

Application of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry or fluorescence detection for the determination of doxorubicin hydrochloride in the air at workplaces

MARZENA BONCZAROWSKA

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

e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl

WIOLETTA MYSUR

<https://orcid.org/0009-0009-3664-2279>

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

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

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. J. Nofera w Łodzi
Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

Numer CAS 25316-40-9

Streszczenie

Chlorowodorek doksorubicyny (DOX) w temperaturze pokojowej jest krystalicznym ciałem stałym o czerwonym zabarwieniu. Związek stosuje się jako cytostatyk w leczeniu różnych postaci raka (rak jajnika, rak płuca, rak piersi, rak żołądka). Jest także stosowany jako cytostatyk w praktyce weterynaryjnej. Doksorubicyna podejrzewana jest o działanie rakotwórcze dla ludzi i negatywny wpływ na rozrodczość. DOX może działać również kardiotoxicznie oraz hamująco na czynność szpiku kostnego. Celem pracy było przygotowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu na stanowiskach pracy, która umożliwi pomiar stężenia tego związku, a następnie pozwoli na dokonanie oceny narażenia zawodowego. Metoda polega na zatrzymaniu chlorowodoru doksorubicyny na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra mieszaniną acetonitryl: woda z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu techniką LC-MS/MS lub LC-FLD. Zaproponowany sposób ekstrakcji DOX z filtrów umożliwi wysoki odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość wydajności ekstrakcji wynosi 105,5%. Zależność wskazań spektrometru mas lub detektora fluorescencyjnego w funkcji stężeń DOX ma charakter liniowy (odpowiednio $r = 0,9994$ i $r = 0,9993$) w zakresie stężeń $0,0108 \div 0,216 \mu\text{g/ml}$. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania normy PN-EN 482:2021-08 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda oznaczania chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury

¹ Opracowano i wydano na podstawie wyników VI etapu programu wieloletniego pn. „Rządowy Program Poprawy Bezpieczeństwa i Warunków Pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr III.PN.05 pt. „Opracowanie metod oznaczania 12 szkodliwych substancji chemicznych w powietrzu na stanowiskach pracy do oceny narażenia zawodowego”. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

analitycznej, którą zamieszczono w załączniku. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: chlorowodorek doksorubicyny, czynnik rakotwórczy, metoda analityczna, metoda chromatografii cieczowej, spektrometria mas, detekcja fluorescencyjna.

Abstract

Doxorubicin hydrochloride (DOX) in room temperature is a red crystalline solid. It is used as an antineoplastic drug in therapy of certain types of cancer (ovarian cancer, lung cancer, breast cancer, gastrointestinal cancer). It is also used as cytostatic in veterinary practice. Doxorubicin is suspected to be carcinogenic to humans and have negative impact for reproduction. DOX can also cause bone marrow suppression and act as a cardiotoxic agent. The aim of the study was to prepare a suitably sensitive and selective method for the determination of doxorubicin in air at workplaces, which will enable the measurement of concentrations of this compound and then allow occupational exposure to be assessed. This method is based on the collection of DOX on glass fiber filter, extraction with mixture of acetonitrile: water with addition of formic acid (0.1%), and chromatographic determination of resulted solution with LC-MS/MS or LC-FLD technique. The average extraction efficiency of DOX from filters amounted to 105.5%. Method is linear ($r=0.9994$ or 0.9993) within the investigated working range from $0.0108 \mu\text{g/ml}$ to $0.216 \mu\text{g/ml}$ for LC-MS/MS and LC-FLD technique respectively. The method has good precision and accuracy and meets the requirements of EN 482:2021-08 for procedures for the determination of chemical agents. The developed method for the determination of doxorubicin hydrochloride in air at workplaces was written in the form of an analytical procedure, which is included in Appendix. The thematic scope of the article includes the issues of health and safety and hygiene of the working environment being the subject of research in health sciences and environmental engineering.

Keywords: doxorubicin hydrochloride, carcinogen, analytical method, liquid chromatography method, mass spectrometry, fluorescence detection.

Adres do korespondencji/Contact details: Marzena Bonczarowska, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera, 91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, e-mail: marzena.bonczarowska@imp.lodz.pl

WPROWADZENIE

Charakterystyka substancji

Dokсорubicyna oraz chlorowodorek dokсорubicyny (DOX) w temperaturze pokojowej występują w postaci pozbawionego zapachu czerwonego proszku. Chlorowodorek dokсорubicyny bardzo łatwo rozpuszcza się w wodzie i w wodnych roztworach alkoholi, natomiast nie rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. Chlorowodorek dokсорubicyny jest w Polsce głównym składnikiem do przygotowywania preparatów leczniczych zawierających dokсорubicynę (Kupczewska-Dobecka 2020). DOX jest stosowany jako cytostatyk w leczeniu ostrych białaczek, chłoniaka, raka sutka, raka płuca, raka pęcherza moczowego, raka jajnika, tarczycy i kory nadnerczy oraz szpiczaka mnogiego, ziarnicy złośliwej i mięsaków. Stosuje się go także jako cytostatyk w praktyce weterynaryjnej. Szkodliwe działanie dokсорubicyny manifestuje się uczuciem dyskomfortu, nudnościami,

wymiotami, zapaleniem jamy ustnej oraz utratą włosów. Chlorowodorek dokсорubicyny podobnie jak dokсорubicyna może również działać drażniaco na błony śluzowe oczu i powodować podrażnienie, łzawienie oraz zaczerwienienie spojówek. Długotrwałe narażenie na pył dokсорubicyny lub jej chlorowodoru może być przyczyną zaburzeń funkcji płuc oraz zmian alergicznych na skórze. Substancje te są podejrzewane również o działanie kardiotoksyczne i działanie hamujące czynność szpiku kostnego, a także działanie mutagenne i genotoksyczne. Eksperti IARC zaliczyli dokсорubicynę do grupy 2A, tj. do grupy związków o prawdopodobnym działaniu rakotwórczym dla ludzi (IARC 1987). Dokсорubicyna i jej chlorowodorek są również uważane za substancje działające szkodliwie na rozrodczość i wykazujące działanie embriotoksyczne (Kupczewska-Dobecka 2020; PubChem 2023).

Zarówno dokсорubicyna, jak i jej chlorowodorek nie zostały zaklasyfikowane urzędowo w Unii Europejskiej zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu

Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie WE nr 1907/2006. Większość producentów chlorowodoru doksorubicyny klasyfikuje tę substancję pod kątem działania rakotwórczego (Carc. 1B) i ostrego działania toksycznego (Acute Tox. 4); z przypisanymi zwrotami „H350: Może powodować raka” i „H302: Działa szkodliwie po połknięciu” (ECHA 2023).

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 19 lutego 2021 r. zmieniającym rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy z dnia 12 czerwca 2018 r. wartość NDS dla doksorubicyny lub chlorowodoru doksorubicyny (frakcja wdychalna) wynosi 0,0003 mg/m³ (DzU 2021, poz. 325).

Założenia opracowanej metody

Opracowana w 2018 r. metoda oznaczania DOX w środowisku pracy zakładała wykorzystanie do tego celu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (Szewczyńska, Pośniak 2018) i obejmowała zakres oznaczania w granicach 1/5 ÷ 3,3 wartości NDS (0,00006 ÷ 0,001 mg/m³), co nie spełnia obecnie wymagań normy PN-EN-482, zgodnie z którą metoda analityczna musi umożliwiać oznaczanie badanego związku w granicach 1/10 ÷ 2 wartości NDS. Celem pracy było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania DOX w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiar stężenia tego związku zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482.

Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru doksorubicyny wskazują, że związek ten może występować w środowisku pracy w postaci pyłu lub aerozolu. Z tego względu do pobierania próbek powietrza można zastosować filtry z włókna szklanego umieszczone w głowicach do wyodrębniania frakcji wdychalnej pyłu bądź aerozolu. Do oznaczania doksorubicyny lub jej chlorowodoru stosuje się głównie metody chromatograficzne z różnymi systemami detekcji, takimi jak: spektrofotometria (LC-UV-VIS), (Bartzatt, Weidner 2012; Dharmalingam i in. 2014; Sanogo i in. 2021;

Szewczyńska, Pośniak 2018), fluorescencja (LC-FLD), (Daeihameda i in. 2014; Lucas i in. 2016; Mahnik i in. 2006; Pieri i in. 2010; Shah i in. 2018), spektrometria mas (LC-MS/MS), (Cotteret i in. 2022; Dal Bello i in. 2016; Ma i in. 2015; Lema-Atán i in. 2022; Portilha-Cunha i in. 2021; Roussin i in. 2021; Villa i in. 2020; Wang i in. 2016). Znacznie rzadziej w oznaczeniach DOX stosowane są metody spektrofotometryczne (UV-VIS), (Bartzatt, Weidner 2012) lub micelarna chromatografia elektrokinetyczna (Nogueira-Librelotto i in. 2019).

Większość prac dotyczy oznaczania DOX w próbkach materiału biologicznego lub w preparatach farmaceutycznych. W przypadku oznaczeń doksorubicyny (oraz innych cytostatyków) w powietrzu zastosowanie znalazły filtry z nitrocelulozy (Jung i in. 2023; Solaß i in. 2013) lub częściej z włókna szklanego (Bonczarowska i in. 2018; Szewczyńska i in. 2010; Szewczyńska, Pośniak 2018; Turci i in. 2000). Z tego względu zdecydowano o wykorzystaniu do pobierania próbek powietrza filtrów z włókna szklanego. Do oznaczeń ilościowych wybrano technikę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykorzystywaną w oznaczeniach innych leków z tej grupy, jak również metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD) ze względu na deklarowaną wysoką czułość oznaczeń DOX w próbkach materiału biologicznego (Daeihameda i in. 2014; Lucas i in. 2016; Shah i in. 2018).

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Przy opracowaniu metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny w powietrzu na stanowiskach pracy przyjęto następujące założenia:

- pobieranie jednej próbki na zmianę roboczą
- objętość pobranego powietrza nie mniejsza niż 720 l
- zakres pomiarowy 0,0108 ÷ 0,216 µg/ml, co dla próbki powietrza 720 l odpowiada zakresowi 0,00003 ÷ 0,0006 mg/m³.

Aparatura

Do badań stosowano następującą aparaturę: aspiratory indywidualne GilAir 3, umożliwiające pobieranie próbek powietrza w strefie oddychania pracownika ze stałym strumieniem objętości

120 l/h (Sensidyne, USA), próbники do poboru frakcji wdychalnej typu IOM (Zefon, USA), chromatograf cieczowy Waters Acquity I Class Plus wyposażony w: binarny system pomp wysokociśnieniowych, dozownik automatyczny, termostat, komputer z oprogramowaniem MassLynx oraz kolumnę analityczną Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm wypełnioną złożem typu C18 o średnicy ziaren 1,8 μm, sprzężony z tandemowym spektrometrem mas Waters Xevo TQ-XS (Waters, USA), chromatograf cieczowy Waters Acquity Arc wyposażony w: poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, dozownik automatyczny (autosampler), termostat, detektor fluorescencyjny Waters 2475, komputer z oprogramowaniem Empower 3 oraz kolumnę analityczną Waters XTerra 150 mm × 2,1 mm wypełnioną złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 μm (Waters, USA), mieszadło mechaniczne (Uniwersalne Mieszadło Hematologiczne WIGO, Polska), wagę analityczną (Sartorius Research, USA).

Materiały

Badania wykonano z zastosowaniem: naczynek szklanych o pojemności 2 ml i 4 ml, kolb miarowych o pojemności 1 ml, 2 ml, 5 ml i 1000 ml, pipet automatycznych nastawnych o pojemności: 0,01 ÷ 0,1 ml, 0,1 ÷ 1 ml i 0,5 ÷ 5 ml, filtrów z PTFE o średnicy 13 mm i średnicy porów 0,45 μm (LLG), filtrów z włókna szklanego o średnicy 25 mm i wielkości porów 1,6 μm (Whatman GF/A).

Odczynniki i roztwory

Stosowano następujące odczynniki i roztwory: acetonitryl o czystości do LC-MS (J.T. Baker, USA), chlorowoderek doksorubicyny (CRM Supelco), acetonitryl o czystości do LC-MS (J.T. Baker), *N*-hydroksymocznik (CRM Supelco), metotreksat (CRM Supelco), cyklofosfamid (CRM Supelco), etopozyd (Merck), 5-fluorouracyl (CRM Supelco), ifosfamid (CRM Supelco), paklitaksel (Supelco), docetaksel (Supelco), kwas mrówkowy (Alchem), woda o czystości do LC-MS (Hydrolab, Polska), roztwór do ekstrakcji – mieszanina acetonitrylu i wody w stosunku objętościowym 1: 1 z dodatkiem kwasu mrówkowego stanowiącym 0,1% mieszaniny.

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej i parametrów pracy spektrometru mas (LC-MS/MS)

Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy doksorubicyny techniką LC-MS/MS wykonywano z użyciem ultrasprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas oraz kolumny analitycznej Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm. Jako fazę ruchomą (elucja gradientowa) zastosowano acetonitryl z dodatkiem kwasu mrówkowego stanowiącym 0,1% mieszaniny i wodę również z dodatkiem kwasu mrówkowego stanowiącym 0,1% mieszaniny. Optymalizacji poddano takie parametry pracy detektora mas, jak: napięcie kapilary sondy ESI, napięcie źródła jonów, napięcie ekstraktora i soczewek; temperaturę desolwatacji i źródła jonów; przepływy gazów oraz parametry pracy komory kolizyjnej. Charakterystyczną dla doksorubicyny fragmentację w komorze kolizyjnej jonu molekularnego ($M+H^+$), (m/z 544,2) do jonu potomnego (m/z 397,0) dobrano na podstawie danych literaturowych (Villa i in. 2020; Wang i in. 2016).

W celu dobrania optymalnych parametrów rozdzielania chromatograficznego mieszaniny cytostatyków oraz parametrów pracy spektrometru mas przygotowano mieszaninę złożoną z ośmiu związków z grupy cytostatyków (metotreksat, cyklofosfamid, 5-fluorouracyl, etopozyd, doksorubicyna, ifosfamid, docetaksel i paklitaksel), którą analizowano w warunkach charakterystycznych dla oznaczeń DOX.

Zastosowanie w analizie chromatograficznej kolumny analitycznej Waters ACQUITY UPLC HSS T3 wymywanej mieszaniną acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (elucja gradientowa) umożliwia rozdzielanie analizowanych związków. Optymalne warunki analizy DOX techniką LC-MS/MS przedstawiono w tabeli 1 i 2.

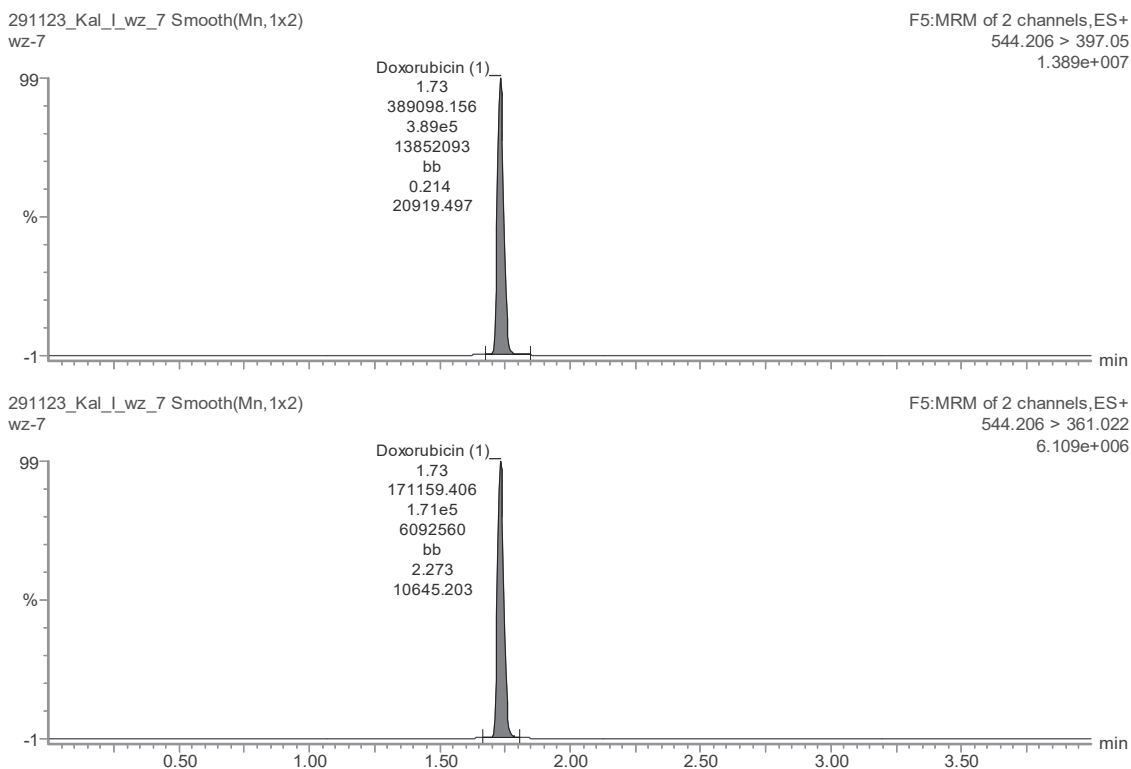
Zastosowanie w analizie tandemowego spektrometru mas zapewnia w danych warunkach analitycznych selektywność oznaczeń danego związku w przypadku obecności innych cytostatyków. W przypadku DOX jon pseudomolekularny ($M+H^+$) m/z 544,2 ulega fragmentacji w komorze kolizyjnej, w wyniku czego powstają: jon potomny m/z 397,0 (jon kwantyfikujący) oraz jon m/z 361,0 potwierdzający poprawną identyfikację badanego związku (jon potwierdzający), (ryc. 1).

Tabela 1. Warunki pracy chromatografu ciekowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas
Table 1. Working conditions of a liquid chromatograph coupled with a tandem mass spectrometer

Kolumna analityczna Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm			
Faza ruchoma		roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (%) A	roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (%) B
Program – gradient (v: v)	0 min	85	15
	0,2 min	85	15
	4 min	0	100
	4,5 min	0	100
	5 min	85	15
	8 min	85	15
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej		0,5 ml/min	
Temperatura kolumny / próbki		40°C/5°C	
Objętość próbki		0,5 µl	

Tabela 2. Warunki pracy tandemowego spektrometru mas podczas analiz doksorubicyny
Table 2. Working conditions of tandem mass spectrometer during doxorubicin analysis

Analiza MS/MS		Parametr	Wartość
Tryb MRM (Multiple Reaction Monitoring)		Źródło jonów	
		jonizacja	ES +
		napięcie kapilary	1,5 kV
		napięcie źródła jonów	40 V
DOX: jon macierzysty 544,2 m/z jony potomne: kwantyfikujący 397,0 m/z potwierdzający 361,0 m/z		temperatura źródła jonów	150°C
		temperatura desolwatacji	600°C
		przepływ azotu w źródle jonów	150 l/h
		przepływ gazu desolwatacyjnego (azot)	1100 l/h
		ciśnienie gazu nebulizacyjnego	7 bar
		Komora kolizyjna	
		przepływ gazu kolizyjnego (argon)	0,15 ml/min
		energia kolizji (tryb MS/MS)	20 eV
		Analizator	
		rozdzielczość niskich mas 1 (LMR-1)	2,82
rozdzielczość wysokich mas 1 (HMR-1)	14,55		
energia jonów 1 - 0,4	-0,4		
rozdzielczość niskich mas 2 (LMR-2)	2,83		
rozdzielczość wysokich mas 2 (HMR-2)	14,87		
energia jonów 2	0,4		
wzmocnienie	1		



Rycina 1. Chromatogram mieszaniny ośmiu cytostatyków (metotreksat, cyklofosfamid, 5-fluorouracyl, etopozyd, doksorubicyna (RT 1,73 min), ifosfamid, docetaksel i paklitaksel) zarejestrowany w warunkach charakterystycznych dla oznaczeń doksorubicyny. LC-MS/MS
Figure 1. Chromatogram of mixture of eight cytostatics (methotrexate, cyclophosphamide, 5-fluorouracyl, etoposide, doxorubicin (RT 1.73 min), iphosphamide, docetaxel i paklitaxel) recordet in chromatographic conditions characteristic for DOX determination. LC-MS/MS

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej i parametrów pracy spektrometru mas (LC-FLD)

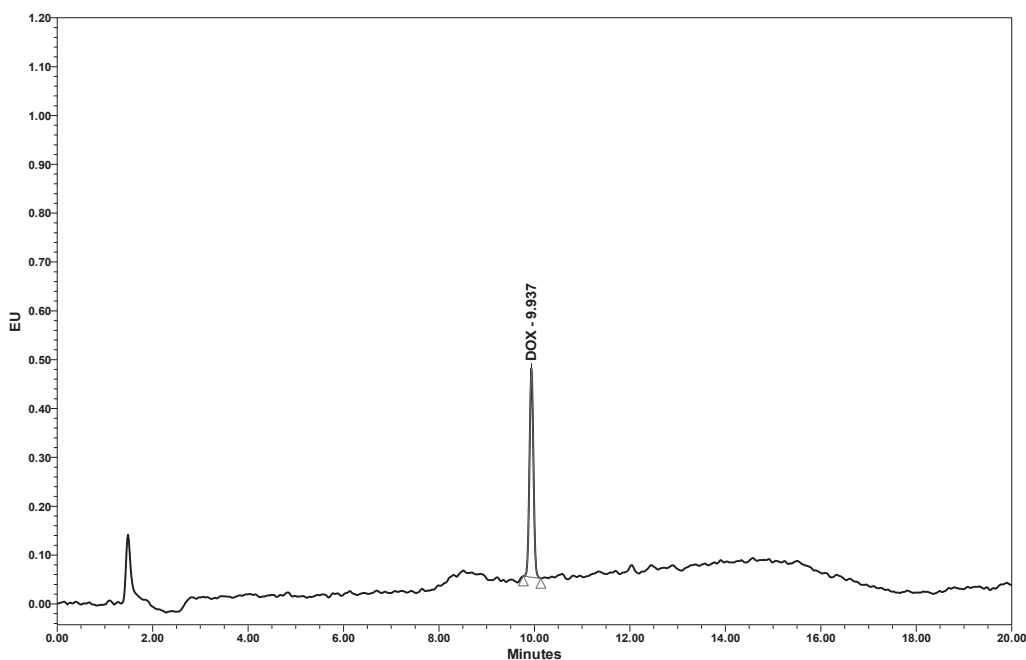
Badania dotyczące możliwości zastosowania techniki LC-FLD do oznaczania stężeń DOX na stanowiskach pracy wykonano przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Waters Acquity Arc z detektorem fluorescencyjnym Waters 2475. Możliwość rozdzielania wieloskładnikowej mieszaniny cytostatyków testowano przy użyciu kolumny analitycznej Waters XTerra 150 mm × 2,1 mm wypełnionej złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 μm. Jako fazę ruchomą stosowano, podobnie jak w przypadku oznaczeń DOX techniką LC-MS/MS, acetonitryl i wodę z dodatkiem kwasu mrówkowego stanowiącego 0,1% mieszaniny. Długość fali wzbudzenia i emisji do oznaczeń DOX metodą LC-FLD dobrano na podstawie danych literaturowych (Lucas i in. 2016).

W przypadku techniki LC-FLD selektywność oznaczeń DOX zapewnia w głównej mierze

zastosowanie detektora fluorescencyjnego (FLD) i właściwy dobór długości fal wzbudzenia i emisji charakterystycznych dla oznaczanego związku. W danych warunkach pracy detektora FLD inne cytostatyki nie wykazują zjawiska fluorescencji przy tak dobranych długościach fali wzbudzenia i emisji i nie przeszkadzają w oznaczeniach DOX (ryc. 2). Optymalne warunki pracy zestawu LC-FLD przedstawiono w tabeli 3.

Badanie zakresu stosowania i liniowości metody analitycznej

W badaniach zastosowano certyfikowany materiał odniesienia (CRM) chlorowodoru doksorubicyny. W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania DOX (1/10 ÷ 2 NDS) przygotowano trzy serie po siedem filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10 μl roztworów wzorcowych chlorowodoru doksorubicyny (przeliczonych na masę czystego związku) o stężeniach: 2,16 μg/ml,



Rycina 2. Chromatogram mieszaniny ośmiu cytostatyków (metotreksat, cyklofosfamid, 5-fluorouracyl, etopozyd, doksorubicyna (RT 9,937 min), ifosfamid, docetaksel i paklitaksel). Detektor FLD λ_{wzb} – 470 nm, λ_{em} – 590 nm

Figure 2. Chromatogram of mixture of 8 cytostatics (methotrexate, cyclophosphamide, 5-fluorouracyl, etoposide, doxorubicin (RT 9.937 min), iphosphamide, docetaxel i paklitaxel). Detector FLD λ_{ex} – 470 nm, λ_{em} – 590 nm

Tabela 3. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym

Table 3. Working conditions of a liquid chromatograph with fluorimetric detector

Kolumna analityczna Waters XTerra 150 mm × 2,1 mm			
Faza ruchoma		roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (%) A	roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (%) B
Program – gradient (v: v)	0 min	85	15
	0,2 min	85	15
	4 min	40	60
	4,5 min	40	60
	5 min	85	15
	8 min	85	15
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej		0,3 ml/min	
Temperatura kolumny/próbki		35°C/10°C	
Objętość próbki		5 μ l	
Długość fali wzbudzenia/emisji		470 nm/590 nm	

4,32 μ g/ml, 8,64 μ g/ml, 21,6 μ g/ml, 32,4 μ g/ml i 43,2 μ g/ml. Na ósmy filtr jako ślepą próbkę naniesiono 10 μ l roztworu do ekstrakcji. Po dokładnym odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do 4-mililitrowych naczynek, dodano 2 ml roztworu do ekstrakcji i poddano je 30-minutowemu wmywaniu mieszałem rolkowym. Uzyskane ekstrakty

przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE i poddano analizie chromatograficznej. Stężenia DOX w 1 ml roztworów wynosiły: 0,0180 μ g, 0,0216 μ g, 0,0432 μ g, 0,108 μ g, 0,162 μ g i 0,216 μ g oraz 0 μ g w ślepej próbce. Roztwory do badań przygotowywano niezależnie dla obu testowanych systemów detekcji (MS/MS i FLD).

LC-MS/MS

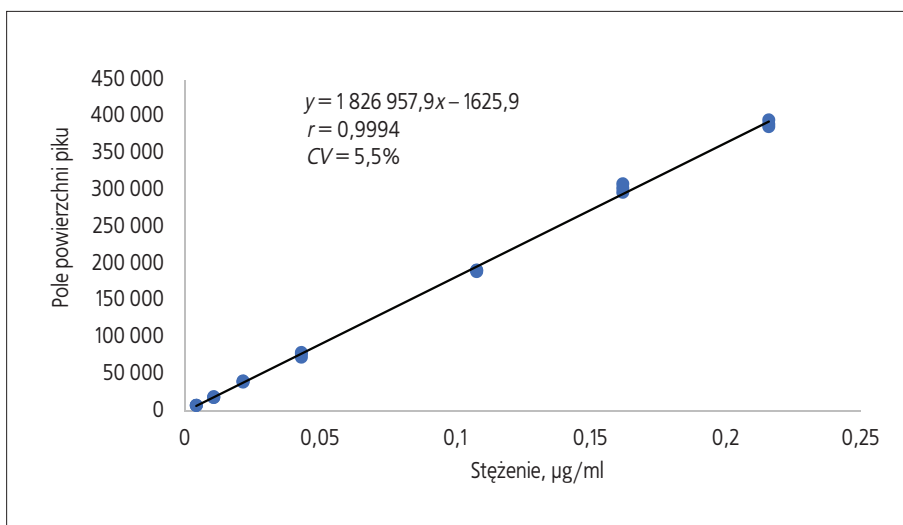
Wyniki badania liniowości metody LC-MS/MS w badanym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 4 i graficznie na rycinie 3. Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi spektrometru mas od stężenia dokсорubicyny ma charakter liniowy w zakresie 0,0108 ÷ 0,216 µg/ml, co dla próbki powietrza 720 l odpowiada zakresowi 0,03 ÷ 0,6 µg/m³. Zależność tę opisuje równanie $y = 1\,826\,957,9x - 1625,9$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) współczynników kalibracji obliczonych dla poszczególnych stężeń trzech serii kalibracyjnych wynosi 5,5%, a współczynnik regresji $r = 0,9994$.

LC-FLD

Wyniki badania liniowości metody w badanym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 5 i graficznie na rycinie 4. Przedstawione w tabeli dane wskazują, że zależność odpowiedzi detektora FLD od stężenia dokсорubicyny ma charakter liniowy w zakresie 0,0108 ÷ 0,216 µg/ml, co dla próbki powietrza 720 l odpowiada zakresowi 0,03 ÷ 0,6 µg/m³. Zależność tę opisuje równanie $y = 8\,778\,455,19x - 14\,585,7$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) współczynników kalibracji obliczonych dla poszczególnych stężeń trzech serii kalibracyjnych wynosi 3,5%, a współczynnik regresji $r = 0,9993$.

Tabela 4. Wyniki wzorcowania chlorowodoru dokсорubicyny (DOX) na filtrze z włókna szklanego – LC-MS/MS
Table 4. Linearity testing of doxorubicin hydrochloride (DOX) on glass fiber filter – LC-MS/MS method

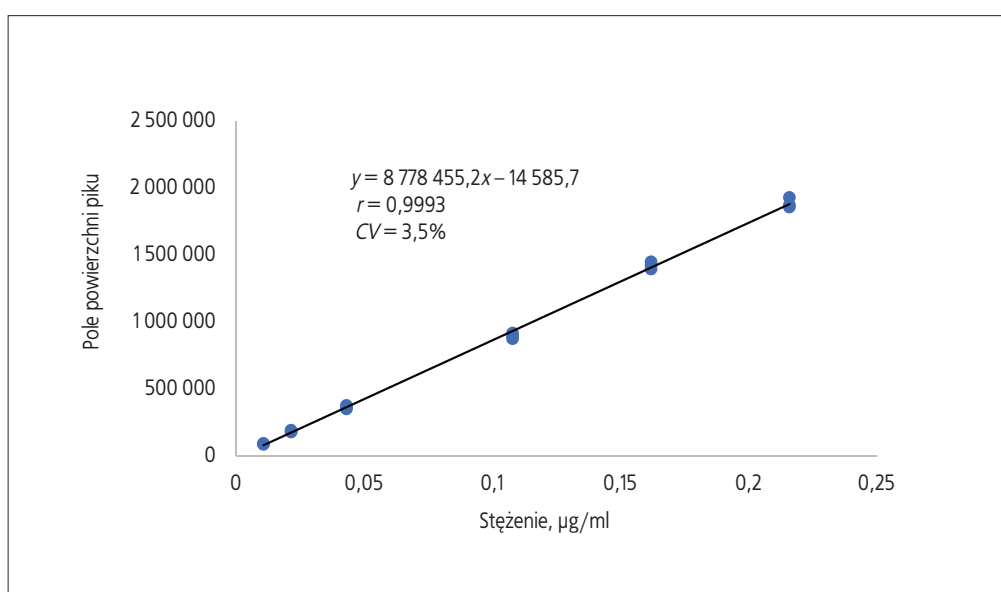
Stężenie DOX, µg/ml	0,0108	0,0216	0,0432	0,108	0,162	0,216
Pole powierzchni pików (PPP)	17 688,7 18 797,8 17 554,7	38 414,1 39 475,5 40 066,3	72 320,3 78 768,8 76 924,5	190 429,6 190 891,7 188 722,8	296 577,3 302 216,6 308 190,1	389 098,2 394 994,0 385 742,3
Średnia PPP	18 013,7	39 318,6	76 004,5	190 014,7	302 328,0	389 944,8
Odchylenie standardowe, SD	682,3	837,2	3 321,2	1142,4	5 807,2	4 683,6
Współczynnik zmienności, CV, %	3,79	2,13	4,37	0,60	1,92	1,20



Rycina 3. Krzywa wzorcowa chlorowodoru dokсорubicyny (DOX) w zakresie 0,0108 ÷ 0,216 µg/ml. LC-MS/MS
Figure 3. Doxorubicin hydrochloride (DOX) calibration curve in the range 0.0108–0.216 µg/ml. LC-MS/MS

Tabela 5. Wyniki wzorcowania chlorowodorku doksorubicyny (DOX) na filtrze z włókna szklanego – LC-FLD**Table 5.** Linearity testing of doxorubicin hydrochloride (DOX) on glass fiber filter – LC-FLD method

Stężenie DOX, µg/ml	0,0108	0,0216	0,0432	0,108	0,162	0,216
Pole powierzchni pików (PPP)	85 438 91 148 92 028	177 364 183 377 190 944	349 847 360 228 376 486	874 577 894 964 917 528	1 449 855 1 395 460 1 425 665	1 930 375 1 874 364 1 857 750
Średnia PPP	89 538,0	183 895,0	362 187,0	895 689,7	1 423 660,0	1 887 496,3
Odchylenie standardowe, SD	3 577,9	6 804,8	13 427,1	21 484,7	27 252,9	380 51,8
Współczynnik zmienności, CV, %	4,0	3,7	3,7	2,4	1,9	2,0

**Rycina 4.** Krzywa wzorcowa chlorowodorku doksorubicyny (DOX) w zakresie 0,0108 ÷ 0,216 µg/ml. LC-FLD**Figure 4.** Doxorubicin hydrochloride (DOX) calibration curve in the range 0.0108–0.216 µg/ml. LC-FLD

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności metody

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności DOX przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (2000).

W tym celu wzorec DOX o stężeniu 0,0108 µg/ml rozcieńczono cztery razy roztworem stosowanym do ekstrakcji. Przygotowano 20 rozcieńczonych roztworów, które poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach określonych dla obu systemów detekcji.

Wyniki analizy dotyczącej wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności DOX z zasto-

sowaniem technik LC-MS/MS i LC-FLD przedstawiono w tabeli 6. Obliczono średnią i odchylenie standardowe z uzyskanych doświadczalnie wartości pól powierzchni pików odpowiadających czasowi retencji DOX. Uwzględniając współczynniki nachylenia krzywych wzorcowych (MS/MS i FLD) wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczania ilościowego metody. Obliczone w taki sposób wartości granic wykrywalności i oznaczalności wynoszą odpowiednio: 0,00026 µg/ml i 0,00086 µg/ml (LC-MS/MS) oraz 0,00012 µg/ml i 0,00041 µg/ml (FLD).

Tabela 6. Wyznaczanie granic wykrywalności (GW) i oznaczalności (GO)
Table 6. Determination of the detection (LOD) and quantification limit (LOQ)

Wyznaczony parametr	Technika analityczna			
	LC-MS/MS		LC-FLD	
Pole powierzchni pików o czasie retencji DOX	3463,8	3263,9	5691	6251
	3664,7	3396,8	5964	6193
	3424,3	3526,7	5657	6645
	3468,2	3093,7	5692	6561
	3652,4	3593,5	5908	6154
	3444,0	3339,9	5978	6543
	3382,1	3333,6	6578	6290
	3458,7	3591,3	6248	6311
	3744,0	3426,4	6507	6453
	3393,4	3686,0	6338	5844
Średnie pole powierzchni, $n = 20$	3467,4		6190,3	
Odchylenie standardowe, SD	157,2		318,0	
Współczynnik zmienności, CV , %	4,5		5,1	
Granica wykrywalności (GW), $\mu\text{g/ml}$	0,00026		0,00012	
Granica oznaczalności (GO), $\mu\text{g/ml}$	0,00086		0,00041	

Badanie warunków pobierania próbek powietrza

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na stopień zatrzymania DOX pobranego na filtr z włókna szklanego przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 10 μl roztworów wzorcowych o stężeniach: 2,16 $\mu\text{g/ml}$, 8,64 $\mu\text{g/ml}$ i 43,2 $\mu\text{g/ml}$. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w próbnikach umożliwiających pobieranie frakcji wdychalnej. Za pomocą aspiratorów indywidualnych przez filtry przepuszczono 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min. Po tym czasie filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml roztworu do ekstrakcji (ACN: H_2O – 0,1-procentowy kwas mrówkowy). Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 μm , a następnie poddano analizie chromatograficznej (LC-MS/MS) w ustalonych wcześniej warunkach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów z filtrów, na które naniesiono roztwory wzorcowe DOX o takich samych stężeniach, przez które nie przepuszczano powietrza.

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza przedstawiono w tabeli 7.

Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika wydajności ekstrakcji wynosi 105,5% ($SD = 4,7$).

Badanie precyzji metody

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano trzy serie po dziesięć filtrów, na które naniesiono po 10 μl roztworów wzorcowych o stężeniach odpowiadających zakresowi badanej metody 1/10 ÷ 2 wartości NDS: 2,16 $\mu\text{g/ml}$, 8,64 $\mu\text{g/ml}$ i 43,2 $\mu\text{g/ml}$. Po 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml mieszaniny ekstrakcyjnej i mieszała mechanicznego ekstraktu po przesączeniu poddano analizie chromatograficznej z wykorzystaniem obu sposobów detekcji.

Wyniki badań precyzji oznaczeń DOX przedstawiono w tabeli 8 i 9. Wskazują one, że założone warunki wykonania analizy pozwalają na precyzyjne wykonanie oznaczeń stężeń DOX w powietrzu. Wartości średnie oraz współczynniki zmienności (CV) rozrzutów uzyskanych wyników dla stężeń 0,0108 $\mu\text{g/ml}$, 0,0432 $\mu\text{g/ml}$ i 0,216 $\mu\text{g/ml}$ wynoszą odpowiednio: 0,0112 ($CV = 4,5\%$), 0,048 ($CV = 6,5\%$) i 0,25 ($CV = 7,5\%$), (LC-MS/MS) oraz 0,0102 ($CV = 4,9\%$), 0,042 ($CV = 1,4\%$) i 0,217 ($CV = 2,2\%$), (LC-FLD). Uzyskane wyniki świadczą

Tabela 7. Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczania chlorowodorku dokсорubicyny (DOX)**Table 7.** Investigation of air sampling conditions for doxorubicin hydrochloride (DOX) determinations

Medium pochłaniające	Stężenie DOX, µg/ml	Pole powierzchni piku		Wydajność ekstrakcji, %	Średnia wartość wydajności ekstrakcji, %
		roztwór kontrolny	roztwór po desorpcji		
Filtr z włókna szklanego	0,0108	12 035,3 14 036,4 14 617,3	14 595,3	107,6	110,5
			14 600,6	107,6	
			16 118,8	118,8	
			15 005,7	110,6	
			14 163,1	104,4	
			15 431,0	113,8	
	<i>SD</i>	5,2			
	<i>CV</i>	4,7%			
	0,0432	64 742,7 70 263,2 68 159,9	68 038,9	100,5	102,8
68 873,2			101,7		
72 142,9			106,5		
69 228,4			102,2		
69 931,8			103,3		
69 400,5			102,5		
<i>SD</i>	2,1				
<i>CV</i>	2%				
0,216	354 550,4 355 413,0 360 950,0	365 996,3	102,5	103,2	
		369 683,8	103,6		
		367 004,4	102,8		
		366 993,7	102,8		
		371 125,2	104,0		
		369 987,0	103,6		
<i>SD</i>	0,6				
<i>CV</i>	0,6%				
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %			105,5		
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>			4,7		
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			4,2		

Tabela 8. Wyniki badania precyzji metody oznaczania chlorowodorku dokсорubicyny (DOX) techniką LC-MS/MS**Table 8.** The results of the precision study of the doxorubicin hydrochloride (DOX) determination method with LC-MS/MS technique

Numer analizy	Stężenie DOX, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1	0,0108	0,011	0,0432	0,042	0,216	0,248
2		0,011		0,043		0,247
3		0,012		0,049		0,307
4		0,011		0,049		0,245
4		0,011		0,050		0,249
6		0,012		0,051		0,244
7		0,012		0,048		0,246
8		0,012		0,050		0,255
9		0,012		0,050		0,244
10		0,012		0,050		0,249
Średnia	0,012		0,048			0,253
<i>SD</i>	0,001		0,003			0,019
<i>CV</i> , %	4,5		6,5			7,5

Tabela 9. Wyniki badania precyzji metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DOX) techniką LC-FLD
Table 9. The results of the precision study of the doxorubicin hydrochloride (DOX) determination method with LC-FLD technique

Numer analizy	Stężenie DOX, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1	0,0108	0,0088	0,0432	0,042	0,216	0,225
2		0,0104		0,042		0,213
3		0,0103		0,042		0,219
4		0,0106		0,042		0,221
4		0,0103		0,042		0,218
6		0,0103		0,042		0,219
7		0,0105		0,042		0,216
8		0,0105		0,042		0,216
9		0,0103		0,041		0,208
10		0,0102		0,041		0,212
Średnia		0,010		0,042		0,217
SD		0,001		0,001		0,005
CV, %		4,9		1,4		2,2

o wysokiej, w założonym zakresie pomiarowym, precyzji oznaczeń DOX osiąganą przy zastosowaniu obu technik detekcji.

Badanie trwałości próbek DOX pobranych na filtry z włókna szklanego

W celu zbadania trwałości pobranych na filtry próbek powietrza zawierającego DOX przygotowano trzy serie po 24 filtry szklane, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych o stężeniach: 2,16 µg/ml, 8,64 µg/ml i 43,2 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml, szczelnie zamknięto i przechowywano w chłodziarce. Po 4, 8, 12 i 18 dniach przechowywania przeprowadzono analizę sześciu filtrów z każdego stężenia. Do filtrów dodano 2 ml roztworu mieszaniny do ekstrakcji, a następnie poddano je 30-minutowemu wymywaniu mieszałem mechanicznym. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej (LC-MS/MS) w ustalonych wcześniej warunkach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku z uzyskanych ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców DOX o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania pobranych próbek DOX przedstawiono na rycinie 5. Wyniki wykonanych badań wskazują, że próbki DOX pobrane na filtry z włókna szklanego i przechowywane w chłodziarce są trwałe przez co najmniej 18 dni. Wyrażone w procentach średnie wartości współczynnika wydajności ekstrakcji dla

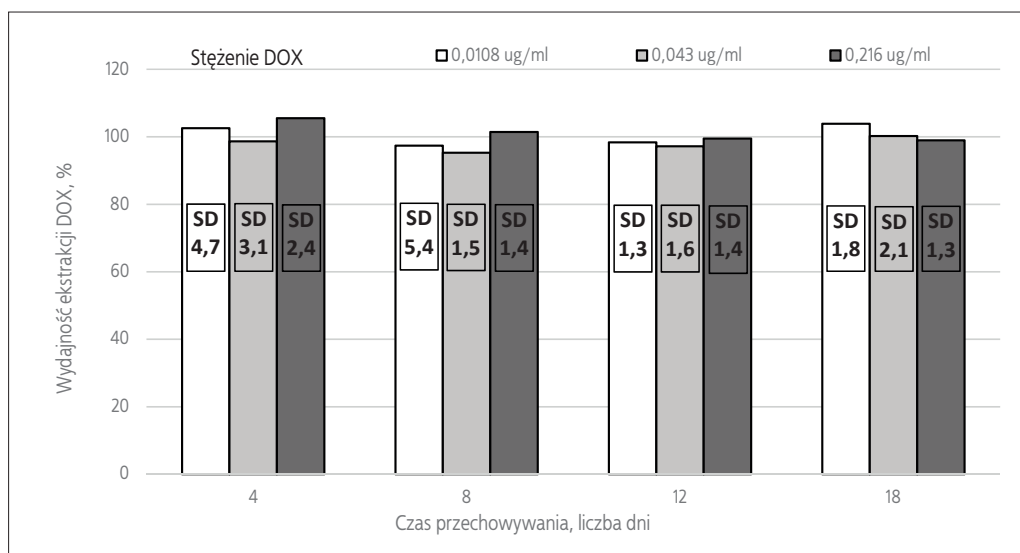
poszczególnych stężeń DOX na filtrze (0,0216 µg/filtr, 0,0864 µg/filtr, 0,432 µg/filtr) wynoszą odpowiednio: 103,9% (SD – 1,8), 100,2% (SD – 2,1) i 99,0% (SD – 1,3). Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika wydajności ekstrakcji DOX po 18 dniach przechowywania próbek wynosi 102,3% (SD – 2,6).

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w Normie Europejskiej PN-EN 482:2021-08. Wyznaczone parametry walidacyjne przedstawiono w tabeli 10.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DOX) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas lub detekcją fluorescencyjną. Wskazania tandemowego spektrometru mas oraz detektora fluorescencyjnego w funkcji stężenia DOX w badanym zakresie stężeń (0,0108 ÷ 0,216 µg/ml) mają charakter liniowy. Obie alternatywne metody detekcji zapewniają możliwość precyzyjnego oznaczenia DOX w wymaganym zakresie stężeń (1/10 ÷ 2 NDS). Próbkę powietrza do oznaczeń DOX można pobierać stosując filtry z włókna szklanego. Zatrzymany na filtrze związek należy ekstrahować mieszaniną acetonitrylu i wody w stosunku 1:1 z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%). Próbki pobrane na filtry przechowywane w chłodziarce



Rycina 5. Badanie trwałości próbek chlorowodoru doksorubicyny (DOX) przechowywanych w chłodziarnie
Figure 5. Stability testing of doxorubicin hydrochloride (DOX) samples stored in a refrigerator

Tabela 10. Parametry walidacyjne metody oznaczania chlorowodoru doksorubicyny (DOX)
Table 10. Validation parameters of a method for determining doxorubicin hydrochloride (DOX)

Wyznaczony parametr	Technika analityczna	
	LC-MS/MS	LC-FLD
Zakres pomiarowy, $\mu\text{g/ml}$	0,0108 ÷ 0,216 (0,00003 ÷ 0,0006 mg/m^3 dla próbki powietrza 720 l)	
Granica wykrywalności, $\mu\text{g/ml}$	0,00041	0,00012
Granica oznaczalności, $\mu\text{g/ml}$	0,00086	0,00026
Współczynnik korelacji	$r = 0,9994$	$r = 0,9993$
Niepewność rozszerzona metody	25,5%	24,2%

zachowują trwałość co najmniej 18 dni. Metoda, w wersji przedstawionej w załączniku, umożliwia oznaczanie DOX w powietrzu na stanowiskach pracy w stężeniach od $0,00003 \text{ mg/m}^3$, czyli 0,1 obowiązującej wartości NDS.

Zaproponowana metodyka niezależnie od zastosowanej techniki detekcji jest specyficzna dla doksorubicyny wobec: metotreksatu, cyklofosfamid, 5-fluorouracylu, etopozydu, hydroksymocznika, ifosfamid, docetakselu i paklitakselu.

PIŚMIENICTWO

Bartzatt R., Weidner E. (2012). Analysis for doxorubicin by spectrophotometry and reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC). *Curr. Top. Anal. Chem.* 9, 63–69.

Bonczarowska M., Mikołajewska K., Brzeźnicki S. (2018). Etopozyd – frakcja wdychalna. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 2(96), 161–173.

Cotteret C., Secretan P.-H., Gilles-Afchain L. i in. (2022). External contamination of antineoplastic drug vials: an occupational risk to consider. *Eur. J. Hosp. Pharm.* 29, 284–286.

Daeihameda M., Haeri A., Dadashzadeh S. (2015). A simple and sensitive HPLC method for fluorescence quantitation of doxorubicin in micro-volume plasma: applications to pharmacokinetic studies in rats. *Iran. J. Pharm. Res.* 14(Suppl.), 33–42.

Dharmalingam S.R., Ramamurthy S., Chidambaram K. i in. (2014). A simple HPLC bioanalytical method for the determination of doxorubicin hydrochloride in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. *Trop. J. Pharm. Res.* 13(3), 409–415.

Dal Bello F., Santoro V., Scarpino V. i in. (2016). Antineoplastic drugs determination by HPLC-HRMSn to monitor occupational exposure. *Drug Test. Anal.* 8, 730–737.

Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 3(25), 5–14.

ECHA, European Chemical Agency (2023). <https://echa.europa.eu/pl/information/-/on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/5835> [dostęp: 2023].

IARC, International Agency for Research on Cancer (1987). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Adriamycin (Group 2A), (Suppl. 7). WHO, France, Lyon, 82–83.

Jung W., Park M., Park S.J. i in. (2023). Occupational exposure during intraperitoneal pressurized aerosol chemotherapy using doxorubicin in a pig model. *Saf. Health Work* 14, 237–242.

Kupczewska-Dobecka M. (2020). Doksorubicyna i chlorowodorek doksorubicyny – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(103), 35–70.

Lema-Atán J.Á., Lendoiro E., Paniagua-González L. i in. (2022). LC-MS-MS determination of cytostatic drugs on surfaces and in urine to assess occupational exposure. *J. Anal. Toxicol.* 46, e248–e255. <https://doi.org/10.1093/jat/bkac073>.

Lucas A.T., O'Neal S. K., Santos C.M. i in. (2016). A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 119, 122–129.

Ma W., Wang J., Guo Q. i in. (2015). Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 111, 215–221.

Mahnik S.N., Rizovski B., Fuerhacker M. i in. (2006). Development of an analytical method for the determination of anthracyclines in hospital effluents. *Chemosphere* 65(8), 1419–1425.

Nogueira-Librelotto D.R., Scheeren L.E., Fernandes J.R. i in. (2019). Determination of doxorubicin hydrochloride in pharmaceutical dosage forms by a simple stability-indicating micellar electrokinetic capillary chromatography method. *Drug Anal. Res.* 3, 29–35.

Pieri M., Castiglia L., Basilicata P. i in. (2010). Biological monitoring of nurses exposed to doxorubicin and epirubicin by a validated liquid chromatography/fluorescence detection method. *Ann. Occup. Hyg.* 54(4), 368–376.

PN-EN 482: 2021-08 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężenia czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur.

Portilha-Cunha M.F., Ramos S., Silva A.M.T. i in. (2021). An improved LC-MS/MS method for the analysis of thirteen cytostatics on workplace surfaces. *Pharmaceuticals* 14, 754. DOI: 3390/ph14080754.

PubChem (2023). Doxorubicin hydrochloride. Compound summary. National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin-Hydrochloride> [dostęp: 2023].

Roussin F., Taibi A., Canal-Raffin M. i in. (2021). Assessment of workplace environmental contamination and occupational exposure to cisplatin and doxorubicin aerosols during electro-

static pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy. *Eur. J. Surg. Oncol.* 47, 2939–2947.

Rozporządzenie Ministra Rozwoju, Pracy i Technologii z dnia 18 lutego 2021 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy z dnia 12 czerwca 2018 r. *DzU* 2021 poz. 325.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie WE nr 1907/2006 (tzw. rozporządzenie CLP). *Dz. Urz. UE L* 353 z 31.12.2008 r. ze zm.

Sanogo S., Silimbani P., Gaggeri R. i in. (2021). Development and validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous identification and quantification of Topotecan, Irinotecan, Etoposide, Doxorubicin and Epirubicin. *Arab. J. Chem.* 14(1), 102896. DOI: 10.1016/j.arabj.2020.11.002.

Shah M., Bourner L., Ali S. i in. (2018). HPLC method development for quantification of doxorubicin in cell culture and placental perfusion media. *Separations* 5(1), 9. DOI: 3390/separations5010009.

Solaß W., Giger-Pabst U., Zieren J. i in. (2013). Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC): occupational health and safety aspects. *Ann. Surg. Oncol.* 20, 3504–3511.

Szewczyńska M., Osytek M., Pośniak M. i in. (2010). *N*-Hydroksymocznik – metoda oznaczania. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(63), 155–162.

Szewczyńska M., Pośniak M. (2018). Chlorowodorek doksorubicyny. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 2(96), 115–131.

Turci R., Micoli G., Minoia C. (2000). Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography: ultraviolet or tandem mass spectrometry detection? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 685–691.

Villa A., Tremolet K., Martinez B. i in. (2020). A highly sensitive UHPLC-MS/MS method for urine biological monitoring of occupational exposure to anthracycline antineoplastic drugs and routine application. *J. Chromatogr. B* 1156, 122305. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122305.

Wang J., Li Y., Ma W. i in. (2016). Validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in polymeric micelles in subcellular compartments of MCF-7/Adr cells by protein precipitation-ultrasonic breaking method. *Biomed. Chromatogr.* 31. DOI: 10.1002/bmc.3892.

**PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA FRAKCJI WDYCHALNEJ
CHLOROWODORKU DOKSORUBICYNY NA STANOWISKACH PRACY
METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ
Z TANDEMOWYM SPEKTROMETREM MAS LUB Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ**

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania chlorowodorku doksorubicyny (numer CAS: 25316-40-9) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas lub detekcją fluorescencyjną. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie chlorowodorku doksorubicyny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w normie, wynosi 0,00003 mg/m³.

2. Powołania normatywne

Do stosowania niniejszego dokumentu są niezbędne podane niżej dokumenty, które w całości lub w części zostały w nim normatywnie powołane. W przypadku powołań datowanych ma zastosowanie wyłącznie wydanie cytowane. W przypadku powołań niedatowanych stosuje się ostatnie wydanie dokumentu powołanego (łącznie ze zmianami).

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

PN-EN 481 Atmosfera miejsca pracy – Określenie składu ziarnowego dla pomiaru cząstek zawieszonych w powietrzu.

3. Zasada metody

Metody polega na zatrzymaniu obecnego w badanym powietrzu chlorowodorku doksorubicyny na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji zatrzymanego związku roztworem kwasu mrówkowego w mieszaninie acetonitrylu i wody, a następnie przeprowadzeniu analizy chromatograficznej otrzymanego roztworu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej

z tandemowym spektrometrem mas lub z detekcją fluorescencyjną.

4. Postanowienia ogólne

4.1. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie ważyc z dokładnością do 0,0002 g, o ile nie zaznaczono inaczej.

4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

Czynności, podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać z użyciem środków ochrony indywidualnej, pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Pozostałe po analizie odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji uprawnionym instytucjom.

5. Odczynniki i materiały

Do analizy należy stosować substancje o stopniu czystości co najmniej cz.d.a., o ile nie zaznaczono inaczej, oraz wodę do wykonywania analiz i badań przy użyciu chromatografii cieczonej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS).

5.1. Kwas mrówkowy

Kwas mrówkowy, stężony o ułamku masowym 98 ÷ 100% i gęstości 1,22 g/ml.

5.2. Acetonitryl

Acetonitryl o czystości do LC-MS.

5.3. Chlorowodorek doksorubicyny, certyfikowany wzorzec odniesienia

5.4. Roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu

Do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml acetonitrylu wg punktu 5.2, dodać 1 ml kwasu mrówkowego wg punktu 5.1 i uzupełnić kolbę do kreski acetonitrylem wg punktu 5.2. Zawartość kolby wymieszać.

5.5. Roztwór kwasu mrówkowego

Do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml wody, dodać 1 ml kwasu mrówkowego

wg punktu 5.1 i uzupełnić kolbę do kreski wodą. Zawartość kolby wymieszać.

5.6. Roztwór do ekstrakcji

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

5.7. Roztwór wzorcowy podstawowy chlorowodoru doksorubicyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 1 ml odważyć około 10 mg chlorowodoru doksorubicyny wg punktu 5.3. Substancję rozpuścić w roztworze do ekstrakcji wg punktu 5.6, kolbę uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 5.6 i obliczyć zawartość związku w 1 ml roztworu.

Roztwór przechowywany w chłodziarce zachowuje trwałość przez co najmniej 60 dni.

5.8. Roztwór wzorcowy pośredni chlorowodoru doksorubicyny

Do kolby pomiarowej o pojemności 5 ml odmierzyć pipetą wg punktu 6.7 taką ilość roztworu wzorcowego podstawowego chlorowodoru doksorubicyny wg punktu 5.7, aby końcowe stężenie czystej doksorubicyny wynosiło 1440 µg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 5.6.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

5.9. Roztwory wzorcowe robocze

Do ośmiu kolb pomiarowych o pojemności 1 ml pipetami wg punktu 6.7 odmierzyć następujące objętości roztworu wzorcowego pośredniego chlorowodoru doksorubicyny wg punktu 5.8 w mililitrach: 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75 i 1. Kolby uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 5.6. Stężenia chlorowodoru doksorubicyny (w przeliczeniu na czysty związek) w tak przygotowanych roztworach wynoszą, w mikrogramach na mililitr, odpowiednio: 0; 2,16; 4,32; 8,64; 21,6; 32,4 i 43,2.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas lub chromatograf cieczowy wyposażony w detektor fluorescencyjny umożliwiający wykonanie analizy przy długości fali wzbudzenia λ_{ex} 470 nm i fali emisji λ_{em} 590 nm.

6.2. Filtry

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

6.3. Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie doksorubicyny w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.:

A) kolumna analityczna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową o średnicy ziaren 1,8 µm, długości 100 mm i średnicy wewnętrznej 2,1 mm;

B) kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową, o uziarnieniu 5 µm, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 2,1 mm.

6.4. Próbniki

Stosować zgodnie z instrukcją producenta dostępne w handlu próbki, dla których producent zadeklarował zgodność z PN-EN 481, umożliwiające wyodrębnienie z powietrza frakcji wdychalnej.

6.5. Kolby pomiarowe

Kolby pomiarowe o pojemności 1 ml, 5 ml i 1000 ml.

6.6. Naczynka

Naczynka szklane, zamykane, o pojemności 2 ml i 4 ml.

6.7. Pipety

Pipety automatyczne nastawne o pojemności: 0,010 ÷ 0,1 ml, 0,1 ÷ 1 ml i 0,5 ÷ 5 ml.

6.8. Pompa ssąca

Pompa ssąca umożliwiająca pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości wg rozdziału 7.

6.9. Mieszadło mechaniczne

6.10. Filtry strzykawkowe

Filtry strzykawkowe z politetrafluoroetyleno o średnicy 25 mm i średnicy porów 0,45 µm.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbki powietrza przepuścić przez filtr wg punktu 6.2 umieszczony w próbniku wg punktu 6.4. do 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości zalecanym przez producenta próbника (najczęściej 2 l/min) za pomocą pompy wg punktu 6.8. Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 18 dni.

8. Warunki pracy zestawu do chromatografii cieczowej

8.1. Warunki pracy chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać oddzielenie doksorubicyny od innych substancji występujących w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.3 A optymalne warunki wykonania oznaczania są następujące:

- skład fazy ruchomej patrz tabela 1
- temperatura kolumny 40°C
- strumień objętości fazy ruchomej 0,5 ml/min
- objętość dozowanej próbki 0,5 µl.

Dopuszcza się stosowanie innych kolumn chromatograficznych lub innego składu fazy ruchomej zapewniających możliwość oznaczenia chlorowodoru doksorubicyny.

Tandemowy spektrometr mas:

- źródło jonów jonizacja dodatnia.

Komora kolizyjna:

- gaz kolizyjny argon
- monitorowane przejście reakcji fragmentacji 544,2 m/z do 397,0 m/z
 - jon kwantyfikujący, 544,2 m/z do 361,0 m/z
 - jon potwierdzający.

Pozostałe parametry pracy spektrometru mas, takie jak napięcie kapilary, napięcie źródła jonów, temperatura źródła jonów, temperatura desolwatacji, przepływ gazu desolwatacyjnego, przepływ gazu kolizyjnego, energia kolizji itd., należy określić indywidualnie dla danego typu spektrometru mas.

8.2. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać oddzielenie doksorubicyny od innych substancji występujących w badanym powietrzu. W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.3 B optymalne warunki wykonania oznaczania są następujące:

- skład fazy ruchomej patrz tabela 2
- temperatura kolumny 35°C

Tabela 1. Faza ruchoma o składzie programowanym (tandemowy spektrometr mas)

Czas, min	Objętość roztworu kwasu mrówkowego wg punktu 5.5, %	Objętość roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu wg punktu 5.4, %
0	85	15
0,2	85	15
4	0	100
4,5	0	100
5	85	15
8	85	15

Tabela 2. Faza ruchoma o składzie programowanym (detektor fluorescencyjny)

Czas, min	Objętość roztworu kwasu mrówkowego wg punktu 6.5, %	Objętość roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu wg punktu 6.4, %
0	85	15
3	85	15
10	40	60
11	40	60
11,5	85	15
20	85	15

- strumień objętości fazy ruchomej 0,3 ml/min
- objętość dozowanej próbki 5 μ l
- długość fali wzbudzenia/emisji 470 nm/590 nm.

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

9. Sporządzanie krzywej wzorcowania

Na osiem filtrów wg punktu 6.2 nanieść pipetami automatycznymi wg punktu 6.7 po 10 μ l roztworów wzorcowych roboczych chlorowodoru doksorubicyny wg punktu 5.9. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6. Do każdego naczynka dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i przeprowadzić ekstrakcję przez 30 min przy użyciu mieszadła mechanicznego. Zawartość czystej doksorubicyny w 1 ml tak uzyskanych roztworów wynosi w mikrogramach: 0,0180; 0,0216; 0,0432; 0,108; 0,162 i 0,216. Ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.5, naczynka szczelnie zamknąć. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 8. Z każdego roztworu wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Sporządzić wykres krzywej wzorcowania, odkładając na osi odciętych zawartość doksorubicyny, w mikrogramach, w 1 ml otrzymanych roztworów, a na osi rzędnych średnie wartości pola powierzchni pików badanego związku.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie wykresu krzywej wzorcowania.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbki powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.6, dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i przeprowadzić ekstrakcję przez 30 min przy użyciu mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.6, naczynka szczelnie zamknąć. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 8. Z każdego roztworu wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość doksorubicyny w badanym roztworze, w mikrogramach, odczytać z krzywej wzorcowej.

11. Obliczanie wyniku oznaczenia

Stężenie doksorubicyny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny wg wzoru:

$$X = \frac{C}{V} \cdot 2$$

w którym:

- C – zawartość doksorubicyny w 1 ml roztworu po ekstrakcji, odczytana z krzywej wzorcowania, w mikrogramach;
- V – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w litrach;
- 2 – ilość roztworu zużyta do ekstrakcji.