

# Metotreksat

## Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy<sup>1</sup>

### Methotrexate

#### Determination method in workplace air

dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

e-mail: slawek@imp.lodz.pl

mgr MARZENA BONCZAROWSKA

e-mail: marzena@imp.lodz.pl

mgr inż. KAROLINA MIKOŁAJEWSKA

e-mail: kmikolaj@imp.lodz.pl

Instytut Medycyny Pracy

im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi

91-348 Łódź

ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Numer CAS 59-05-2

**Słowa kluczowe:** metotreksat, cytostatyki, metoda analityczna, chromatografia cieczowa, powietrze na stanowiskach pracy.

**Keywords:** methotrexat, cytostatics, analytical method, liquid chromatography, workplace air.

#### Streszczenie

Metotreksat (MTX) w temperaturze pokojowej występuje w postaci krystalicznego proszku o intensywnej żółtej barwie i delikatnym zapachu, charakterystycznym dla związków aromatycznych. Związek ten stosuje się jako lek cytostatyczny w terapii chorób nowotworowych. Zawodowe narażenie na metotreksat występuje podczas produkcji leku oraz w trakcie jego przygotowania i podawania w oddziałach chemioterapii. Inhalacyjne narażenie na metotreksat może powodować podrażnienie oczu i błon śluzowych

nosa. Innymi szkodliwymi objawami działania metotreksatu są: dreszcze i gorączka, pocenie się, bóle stawów i mięśni, zmniejszenie odporności na zakażenia, posocznica, zakażenia górnych dróg oddechowych, osteoporoza, hipogammaglobulinemia, zapalenie pęcherza moczowego, trudności w oddawaniu moczu, upławy, cukrzyca, a nawet nagła śmierć. Narażenie na metotreksat może również powodować: zahamowanie czynności szpiku, uszkodzenie wątroby oraz upośledzenie płodności.

<sup>1</sup> 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 Pracy i Polityki Społecznej (Ministerstwo Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej).

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

Z uwagi na rosnące stosowanie metotreksatu liczba osób narażonych na ten lek może sięgać w Polsce kilku tysięcy osób.

Celem pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania stężeń metotreksatu w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie od 1/10 do 2 zaproponowanej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS), zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Do badań wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas. Rozdziałów chromatograficznych dokonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 150 x 3 mm o uziarnieniu 5 µm, którą wymywano mieszaniną metanolu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego.

Metoda polega na: zatrzymaniu obecnego w powietrzu metotreksatu na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny metanol: woda z dodatkiem (0,1%-procentowego kwasu mrówkowego) i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu z użyciem zestawu HPLC-MS/MS. Zaproponowany sposób ekstrak-

cji metotreksatu z filtrów umożliwi pełny odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość współczynnika odzysku wynosi 90%. Zależność wskazań detektora mas w funkcji stężeń metotreksatu ma charakter liniowy ( $r = 0,999$ ) w zakresie stężeń  $0,00007 \div 0,0028 \text{ mg/m}^3$  (dla próbki powietrza 720 l). Obliczone granice wykrywalności i oznaczania ilościowego wynoszą odpowiednio 0,0013 i 0,0044 µg/ml.

Opisana w niniejszym artykule metoda zapewnia, dzięki zastosowaniu techniki HPLC-MS/MS, możliwość specyficznego i selektywnego oznaczenia metotreksatu w obecności innych związków na poziomie  $0,00007 \text{ mg/m}^3$ , tj. na poziomie  $< 1/10$  zaproponowanej wartości NDS. Zapisaną w formie przepisu analitycznego metodę oznaczania metotreksatu – charakteryzującą się dużą precyzją i dokładnością, a także spełniającą wymagania zawarte w normie PN EN 482 stawiane procedurom oznaczania czynników chemicznych w celach oceny narażenia zawodowego – zamieszczono w załączniku.

### Summary

Methotrexate (MTX) is solid at room temperature. It is a yellowish-orange, crystalline powder with a slight odor characteristic of aromatic compounds. Methotrexate is an antineoplastic drug commonly used in the treatment of malignant diseases. Occupational exposure to methotrexate may occur during its production, preparation and application of methotrexate on oncology wards. In terms of exposure by inhalation, methotrexate can irritate the eyes and mucous membranes of the nose. Other adverse effects of methotrexate include chill and fever, sweating, arthralgia, myalgia, decreased resistance to infection, septicemia, upper respiratory infection, osteoporosis, hypogammaglobulinemia, cystitis, dysuria, vaginal discharge, diabetes and death. Exposure to methotrexate may also cause myelosuppression, hepatotoxicity and impaired fertility. Due to the growing use of methotrexate, number of persons occupationally exposed to its harmful effect may reach in Poland several thousand.

The aim of this study was to develop and validate a sensitive method for determining methotrexate concentrations in workplace air in the range from 1/10 to 2 MAC values, in accordance with the requirements of Standard No. PN-EN 482.

The study was performed using a liquid chromatograph with tandem mass detection (HPLC-MS/MS). All chromatographic analyses were performed with Supelcosil LC 18 150 x 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 the collection of methotrexate on a glass fiber filter, extraction with mixture of methanol and water with formic acid (0.1%), and chromatographic analysis of the resulting solution with HPLC-MS/MS technique. The average extraction efficiency of methotrexate from filters was 90%. This method is linear ( $r = 0.999$ ) within the investigated working range of  $0.00007\text{--}0.0028 \text{ mg/m}^3$  for a 720-L air sample. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.0013 and 0.0044 µg/ml, respectively.

The analytical method described in this paper, thanks to the use of HPLC MS/MS technique, makes it possible to selectively determine methotrexate in workplace air in the presence of other compounds at concentrations from  $0.00007 \text{ mg/m}^3$  ( $< 1/10$  proposed MAC value). This method is precise, accurate and it meets the criteria for procedures for measuring chemical agents listed in Standard No. EN 482: 2006. This method can be used for assessing occupational exposure to methotrexate and associated risk to workers' health. The developed method of determining methotrexate has been recorded as an analytical procedure (see appendix).

## WPROWADZENIE

Metotreksat (MTX) w temperaturze pokojowej występuje w postaci krystalicznego proszku o intensywnej żółtej barwie i delikatnym zapachu, charakterystycznym dla związków aromatycznych. Metotreksat jest pochodną aminopteryny oraz strukturalnym analogiem kwasu foliowego. Jest słabym kwasem organicznym z dwiema grupami karboksylowymi. Metotreksat należy do grupy antagonistów kwasu foliowego i jest stosowany jako lek cytotatyczny w terapii chorób nowotworowych. Związki te najsilniej działają na komórki mające zdolność produkcji dużej ilości kwasów nukleinowych, czyli na takie komórki szybko się namnażające, jak np. komórki nowotworowe. Metotreksat jako lek działający niespecyficzenie może wywoływać silne skutki uboczne. W dużych dawkach ( $0,5 \div 12 \text{ g/m}^2$ ) jest stosowany w leczeniu: ostrej białaczki limfatycznej, ostrej białaczki szpikowej, nabłoniaka kosmówkowego raka sutka, raka jajnika, raka płuca, nasieniaka, mięsaka kościopochodnego oraz nowotworów litych głowy i szyi. Mniejsze dawki metotreksatu ( $10 \div 40 \text{ mg/m}^2$ ) działają przeciwapalnie oraz immunosupresyjnie. Lek stosuje się także w takich schorzeniach, jak: łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów oraz zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa.

Narażenie zawodowe może mieć miejsce w szpitalach onkologicznych i w przemyśle farmaceutycznym, ale także w: przychodniach weterynaryjnych, domach opieki, pralniach oraz firmach przetwarzających odpady. Zawodowe narażenie na metotreksat dotyczy w szczególności personelu medycznego (pielęgniarek, lekarzy, farmaceutów, salowych) oraz osób zatrudnionych przy produkcji tego leku. Czynności związane z: otwieraniem ampulek, przenoszeniem leku z pojemnika do pojemnika, rozkruszaniem i podawaniem tabletek, pobieraniem leku strzykawką, wkraplaniem, dozowaniem, a także kontakt z materiałem biologicznym, brudną odzieżą szpitalną oraz z zanieczyszczoną powierzchnią

blatów lub podłogi stanowią ryzyko narażenia. Liczba osób potencjalnie narażonych w Polsce na metotreksat jest trudna do oszacowania. Z uwagi na powszechność stosowania tego leku liczba ta może dochodzić do kilku tysięcy osób.

U osób narażonych zawodowo na metotreksat obserwowano takie objawy, jak: brak apetytu, nudności, wymioty, biegunki, ból głowy, bezsenność, zasłabnięcia, wypadanie włosów oraz takie reakcje alergiczne, jak: wysypka i podrażnienie oczu, przewlekły kaszel, owrzodzenie błony śluzowej nosa, ucisk w klatce piersiowej, arytmia, podwyższone ciśnienie krwi i ogólnie złe samopoczucie. Narażenie na metotreksat może również powodować: zahamowanie czynności szpiku, uszkodzenie wątroby i upośledzenie płodności (Dobecka 2015; HSDB 2015). Grupa Ekspertów ds. Badań nad Rakiem (IARC) uznała, że brak jest dowodów na działanie rakotwórcze metotreksatu u ludzi i zwierząt i zaliczyła związek do grupy 3.

Metotreksat nie został urzędowo sklasyfikowany zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, zwanego rozporządzeniem CLP (Dz. Urz. UE z dnia 31.12.2008 r.). Klasyfikację metotreksatu ze względu na jego działanie szkodliwe, opublikowaną w bazie GESTIS-Stoffdatenbank, przedstawiono w tabeli 1. W Polsce nie ustalono dotychczas wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia dla metotreksatu. Zespół Ekspertów ds. Czynn timerzych Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN zaproponował przyjęcie wartości NDS dla frakcji wdychanej metotreksatu na poziomie  $0,001 \text{ mg/m}^3$ , stwierdzając jednocześnie, że nie ma merytorycznych podstaw do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh), (Dobecka 2015).

**Tabela 1.**  
**Klasyfikacja i oznakowanie metotreksatu (MTX), (GESTIS Stoffdatenbank)**

Klasyfikacja	Oznakowanie
Acute Tox 3 – toksyczność ostra (kat. 3.) Skin Irrit 2 – działanie drażniące na skórę (kat. 2.) Eye Irrit 2 – działa drażniąco na oczy (kat. 2.) Muta 1B – działa mutagenie na komórki rozrodcze (kat. 1.B) Repr. 1A – działa szkodliwie na rozrodczość (kat. A) STOT 3 – działa toksycznie na narządy docelowe (kat. 3.)	H301 – działa toksycznie po połknięciu H311 – działa toksycznie w kontakcie ze skórą H315 – działa drażniąco na skórę H319 – działa drażniąco na oczy H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania H335 – może powodować podrażnienie dróg oddechowych. H340 – może powodować wady genetyczne H360FD – może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki

Celem pracy było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania metotreksatu w powietrzu na stanowiskach pracy,

umożliwiającej pomiary jego stężeń, a następnie pozwalającej na dokonanie oceny narażenia zawodowego.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Materiały i odczynniki

W badaniach zastosowano: kwas mrówkowy (POCH), metanol do LC-MS (JT Baker), wzorzec metotreksatu (Fluka) oraz wodę o czystości do HPLC pochodzącą ze stacji uzdatniania wody firmy Millipore. Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry z włókna szklanego Whatman GF/A  $\phi$  25 mm;  $\phi$  porów 1,6  $\mu$ m). Roztwory przygotowywano, stosując szkło miarowe (kolby, pipety szklane) oraz pipety automatyczne.

### Aparatura

Do badań wykorzystano: aspiratory średnioprzepływowe GilAir 3 firmy Gilian, chromatograf ciekłowy firmy Waters model Alliance 2695 LC System wyposażony w binarny system pomp wysokociśnieniowych, kolumnę analityczną Supelcosil LC-18 150  $\times$  3 mm, 5  $\mu$ m wypełnioną modyfikowanym żelom krzemionkowym typu C18, termostat kolumny analitycznej, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i akwizycji danych (MassLynx 4.0). Zestaw jest sprzężony

z tandemowym spektrometrem mas *micromass quattro micro* API. Do pobierania próbek powietrza stosowano aspiratory średnioprzepływowe GilAir-3 (Gilian) wyposażone w głowice  $\phi$  25 mm, do poboru frakcji wdychalnej (SKC). Do odważania odczynników stosowano wagę analityczną Sartorius, a do ekstrakcji próbek – wytrząsarkę rotacyjną firmy Buchler.

### Warunki oznaczania chromatograficznego

Z danych piśmiennictwa wynika, że najbardziej czułą metodą pozwalającą na oznaczanie metotreksatu w powietrzu na odpowiednio niskim poziomie stężeń jest metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas (HPLC-MS/MS), (*Rubino 2001; Turci 2000; Sabatini 2005; Hon 2014*).

Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy metotreksatu techniką LC-MS/MS wykonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil™ LC-18 150  $\times$  3,0 mm, ziarno 5  $\mu$ m. Jako fazę ruchomą (elucja izokratyczna) zastosowano mieszaninę metanolu i wody z dodatkiem 0,1-procentowe-

go kwasu mrówkowego. Optymalizacji poddano następujące parametry pracy detektora mas:

- napięcia: kapilary, sondy ESI, źródła jonów, ekstraktora oraz soczewek
- temperatury: desolwatacji i źródła jonów
- pracy komory kolizyjnej
- przepływu gazów.

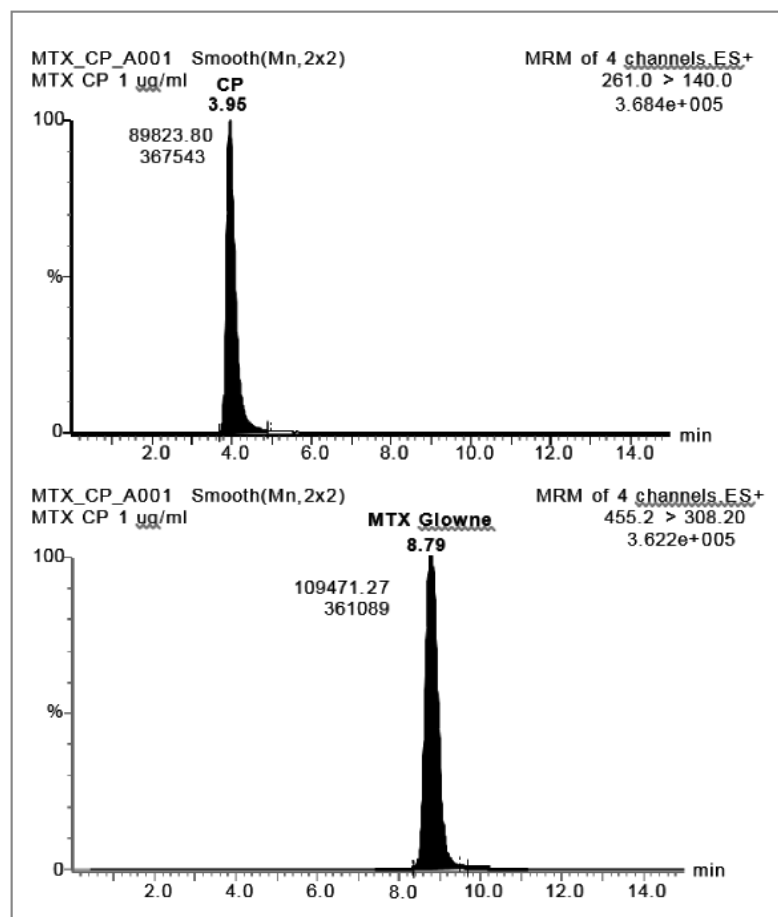
Charakterystyczna dla metotreksatu fragmentacja jonu molekularnego tego związku ( $M+H^+$ ),  $m/z$  455,2 Da) do jonu potomnego ( $m/z$  308,2 Da) została dobrana na podstawie danych z piśmiennictwa (Turci 2000; Sabatini 2005).

Optymalne warunki pracy stosowanego podczas opracowywania metody zestawu LC-MS/MS podano w tabeli 2. Zastosowanie tande-

mowego spektrometru mas zapewnia w danych warunkach analitycznych selektywność oznaczeń metotreksatu w przypadku obecności innych cytotatyków. Analit po rozdiale na kolumnie chromatograficznej jest wprowadzany przez sondę ESI (*electrospray ionisation*) do tandemowego spektrometru mas (MS/MS), gdzie ulega jonizacji, a następnie fragmentacji w komorze kolizyjnej. 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 powinien podlegać fragmentacji charakterystycznej dla metotreksatu. Przykładowy chromatogram mieszaniny metotreksatu i cyklofosfamidu przedstawiono na rysunku 1.

**Tabela 2.**  
**Warunki pracy chromatografu**

Kolumna analityczna Supelcosil™ LC-18- 150 x 3 mm x 5 μm	
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w metanolu (A) ÷ 0,1-procentowy kwas mrówkowy w wodzie (B) 6 ÷ 4 (A: B)
Warunki pracy spektrometru	jonizacja ES +
Fragmentacja jonów: tryb MRM ( <i>multiple reaction monitoring</i> )	napięcie kapilary 3,0 kV
MTX: 455,2→308,2	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



**Rys. 1.** Specyficzność oznaczeń cyklofosfamidu (CP) i metotreksatu (MTX). Kolumna Supelcosil LC-18 150 x 3 mm. Tryb rejestracji wybranych jonów potomnych m/z 140 Da (CP) i 308,2 Da (MTX)

### Dobór optymalnych warunków pobierania próbek powietrza

Zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN-482: 2012 metoda analityczna stosowana do oznaczania stężeń danego związku w powietrzu na stanowiskach pracy powinna być zwalidowana dla zakresu już od  $1/10 \div 2$  wartości obowiązującego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Próbki powietrza do oznaczania metotreksatu należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie PN-Z-04008-7: 2002 (wraz z późniejszą zmianą w normie PN Z 04008-7: 2002/Az1: 2004).

Z uwagi na spodziewane małe stężenia metotreksatu w powietrzu stanowisk pracy założono pobór jednej próbki powietrza w ciągu zmiany roboczej.

Metotreksat może występować w powietrzu stanowisk pracy w postaci pyłu bądź aerozolu. Przegląd piśmiennictwa dotyczący oznaczania cytostatyków w powietrzu wykazał, że najczęściej stosowanym do tego celu medium pochłaniającym są filtry z włókna szklanego (Mason 2005; Yoshida 2010). Z tego względu w badaniach dotyczących: wydajności ekstrakcji, liniowości metody oraz trwałości pobranych próbek stosowano filtry z włókna szklanego Whatman GF/A. Proponowana wartość NDS dla metotreksatu dotyczy frakcji wdychalnej i z tego względu próbki powietrza należy pobierać z określonym strumieniem objętości (120 l/h) za pomocą odpowiednich próbników (Surgiewicz 2013).

### Badanie warunków pobierania, ekstrakcji i przechowywania próbek powietrza do oznaczeń metotreksatu

Należy pamiętać, że metotreksat jest substancją wrażliwą na działanie promieniowania UV (Skibińska 2005; Masanobu 2012) i z tego względu, podczas poboru próbek powietrza próbnik z filtrem należy zabezpieczyć przed jego dostępem. W celu sprawdzenia powstania ewentualnych strat analizowanej substancji podczas pobierania próbek powietrza użyto głowic umożliwiających pobór frakcji wdychalnej. Przygotowano trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10  $\mu$ l roztworów wzorcowych metotreksatu o stężeniach: 5; 20 i 100  $\mu$ g/ml. Głowice z filtrami owijano folią aluminiową i podłączono do aspiratorów średnioprzepływowych. Przez filtry przepuszczano powietrze ze strumieniem objętości 2 l/min przez okres 360 min. Po tym

czasie filtry przenoszono do wial o pojemności 4 ml, ekstrahowano przez 15 min 2 ml mieszaniny metanolu i wody (1:1) z dodatkiem (0,1-procentowego) kwasu mrówkowego za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml i poddawano 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 metotreksatu, ale nie poddano aeracji.

Wyniki badań zebrano w tabeli 3. Wskazują one, że przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje istotnych ilościowych strat metotreksatu naniesionego na filtr. Wartości współczynników odzysku dla trzech analizowanych ilości metotreksatu (0,05; 0,2; 1  $\mu$ g/filtr) wynoszą odpowiednio: 84,9; 93,0 i 91,5% (średnia 89,8%,  $SD - 4,3$ ).

**Tabela 3.**

**Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczeń metotreksatu (MTX) pobranego na filtry z włókna szklanego**

Medium pochłaniające	Zawartość MTX na filtrze, $\mu$ g	Pole powierzchni pików		$WO^a$ , %	Średnia wartość $WO$ , %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr z włókna szklanego	0,05	8379,7	6617,2	79,0	84,9
		8575,5	6526,9	77,9	
		8167,6	7249,3	86,6	
			7215,2	86,2	
			7471,9	89,2	
			7587,0	90,6	
				$SD$ 5,3 $CV$ 6,2	
	0,2	32 058,8	27 415,4	91,5	93,0
		29 252,5	27 358,4	91,3	
		28 586,8	28 159,5	94,0	
			29 234,4	97,6	
			27 562,6	92,0	
			27 408,1	91,5	
				$SD$ 2,5 $CV$ 2,7	

cd. tab 3.

Medium pochłaniające	Zawartość MTX na filtrze, $\mu\text{g}$	Pole powierzchni pików		$WO^a$ , %	Średnia wartość $WO$ , %			
		roztwór kontrolny	ekstrakt					
	1,0	151 434,5	133 571,7	91,6	91,5			
		144 921,3	133 733,7	91,7				
		141 108,9	134 002,7	91,9				
			135 797,9	93,1				
			130 872,8	89,7				
			132 997,2	91,2				
				$SD$ 1,1				
				$CV$ 1,2				
		Średni współczynnik odzysku, $\bar{S}_r$ , %		89,8				
		Odchylenie standardowe, $SD$		4,8				
Współczynnik zmienności, $CV$ , %		5,4						

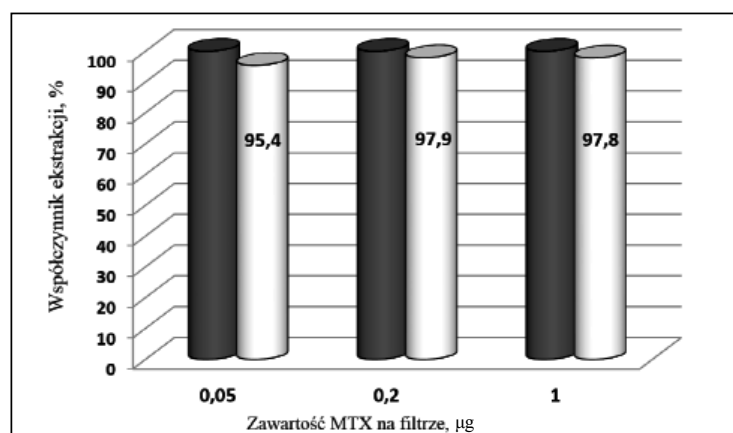
Objaśnienia:

<sup>a</sup>  $WO$  –współczynnik odzysku.

Celem zbadania trwałości metotreksatu pobranego na filtry z włókna szklanego przygotowano dwie serie po osiemnaście filtrów (po sześć filtrów dla każdego stężenia), na które naniesiono po 10  $\mu\text{l}$  roztworów wzorcowych o stężeniach: 5; 20 i 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Po odparowaniu rozpuszczalnika, filtry umieszczano w hermetycznych pojemnikach, zabezpieczano przed dostępem światła i przechowywano w chłodziarce. Po 5 i 10 dniach przechowywania filtry ekstrahowano 2 ml mieszaniny metanolu i wody (1:1) z dodatkiem (0,1-procentowego) kwasu mrówkowego za pomocą wytrząsarki rotacyjnej. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, a następnie poddano analizie chroma-

tograficznej. Uzyskane wartości pól powierzchni pików metotreksatu porównano z wynikami analiz ekstraktów filtrów przygotowanych w dniu badania.

Wyniki badania warunków przechowywania próbek przedstawiono na rysunku 2. Zebrane dane wskazują, iż próbki metotreksatu pobrane na filtry z włókna szklanego, umieszczone w hermetycznych, zabezpieczonych przed dostępem światła pojemnikach i przechowywane w chłodziarce są trwałe co najmniej 10 dni. Po tym okresie przechowywania próbek stwierdzono odpowiednio dla analizowanych ilości metotreksatu (0,05; 0,2 i 1  $\mu\text{g}/\text{filtr}$ ) 95,4; 97,8 i 97,8% pierwotnej ilości analitu (średnia 97%,  $SD$  – 1,4).



**Rys. 2.** Względne wartości współczynników odzysku metotreksatu (MTX) z filtrów przechowywanych w chłodziarce przez okres 10 dni w stosunku do wyników analiz ekstraktów metotreksatu przygotowanych w dniu analizy (100%)



### Kalibracja i precyzja oznaczeń metotreksatu

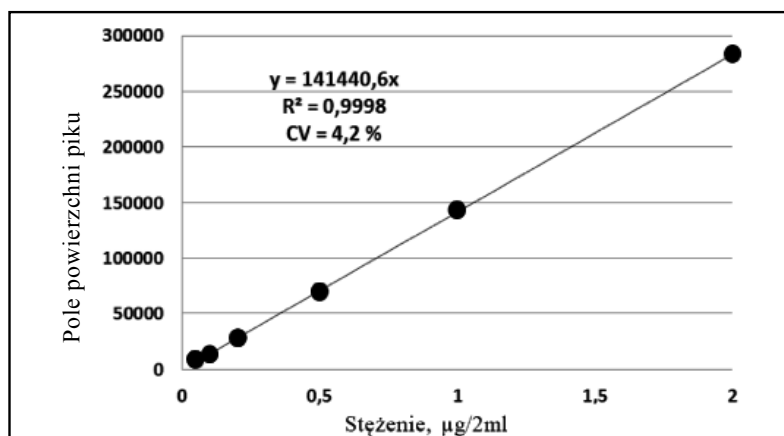
Celem określenia zakresu roboczego metody przygotowano trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego, na które naniesiono po 10  $\mu\text{l}$  roztworów wzorcowych o stężeniach: 0; 5; 10; 20; 50; 100 i 200  $\mu\text{g/ml}$ , co odpowiadało zawartości: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; i 2  $\mu\text{g}$  metotreksatu na filtrze. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w wialach o pojemności 4 ml, zalewano 2 ml metanolu wody (1:1) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego i ekstrahowano za pomocą wyciągarki rotacyjnej przez okres 15 min. Ekstrakty przenoszono do wial o pojemności 2 ml, a następnie poddawano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody przedstawiono graficznie w postaci krzywej kalibracyjnej na rysunku 3. Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi detektora od

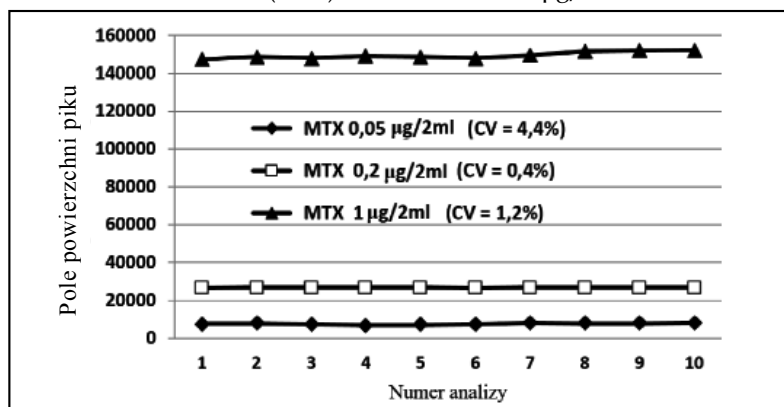
stężenia metotreksatu ma charakter liniowy w zakresie 0,05  $\mu\text{g/ml}$  ÷ 2  $\mu\text{g/2 ml}$ , co odpowiada stężeniom 0,00007 ÷ 0,0028  $\text{mg/m}^3$  (dla próbki powietrza 720 l). Zależność tę opisano równaniem  $y = 141440,6x$ . Wyrażony w procentach błąd względny *CV* wynosi 4,2, a współczynnik korelacji „*r*” jest równy 0,999.

Celem zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia, przygotowano trzy roztwory wzorcowe metotreksatu o stężeniach: 0,05; 0,2 i 1  $\mu\text{g/2 ml}$ . Roztwory poddano analizie chromatograficznej, nastrzykując każdy wzorzec dziesięciokrotnie.

Wyniki badania precyzji metody przedstawiono na rysunku 4. Odchylenia standardowe rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 0,05; 0,2 i 1  $\mu\text{g/2 ml}$  wynoszą odpowiednio: 4,4; 0,4 i 1,2%, co świadczy o dużej precyzji oznaczeń.



Rys. 3. Krzywa wzorcowa metotreksatu (MTX) w zakresie 0,05 ÷ 2  $\mu\text{g/2 ml}$



Rys. 4. Precyzja oznaczeń metotreksatu (MTX) przy zastosowaniu zestawu LC-MS/MS i kolumny Supelcosil LC-18 150 x 3 mm

## Walidacja

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

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- granica wykrywalności,  
 $GW$  0,00013  $\mu\text{g/ml}$

- granica oznaczalności,  
 $GO$  0,00044  $\mu\text{g/ml}$
- współczynnik korelacji,  $r$  0,999
- całkowita precyzja badania,  $V_c$  5,98%
- względna niepewność całkowita 12,54%.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania metotreksatu w powietrzu z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Zastosowanie w analizie monitoringu przejścia (rozpadu) jonu molekularnego metotreksatu ( $m/z$  455 Da) w jon potomny ( $m/z$  308,2 Da) pozwala na jego selektywne oznaczenie w obecności innych związków.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie stężeń metotreksatu w powietrzu w środowisku pracy w zakresie  $0,00007 \div 0,0028 \text{ mg/m}^3$ , tj. od  $< 1/10$  do  $> 2$  wartości proponowanego najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482 i opisana w formie procedury analitycznej zamieszczonej w załączniku.

## PIŚMIENNICTWO

GESTIS Substance Database. 4-Amino-N10-methylpteroylglutamic acid [dostęp: [http://gestisen.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestiseng:sdbeng\\$3.0](http://gestisen.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=templates$fn=default.htm$vid=gestiseng:sdbeng$3.0)].

HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2015) Methotrexate [dostęp: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~F7poS0:1>].

Hon C., Chun P., Danyluk Q. i in. (2014) Examining factors that influence the effectiveness of cleaning antineoplastic drugs from drug preparation surfaces. A pilot study. *J. Oncol. Pharm. Practice*, vol. 20(3), 210–216.

IARC, International Agency for Research for Cancer (2015) Agents classified by the IARC. Monographs. Vol. 1–108 [dostęp: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>].

Kupczewska-Dobecka M. (2015) Metotreksat – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego.

Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 1(83), 73–118.

Masanobu U., Takanori M., Taichi M. i in. (2012) Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction. *BiomedChromatogr* 26, 76–80.

Mason H.J., Blair S., Sams C. i in. (2005) Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. *Ann. Occup. Hyg.*, vol. 49, 7, 603–610.

PN-EN 482: 2012 Powietrze na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.

PN-Z-04008-7: 2002. Az 1: 2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.

Rubino F. M. (2001) Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites.

J. Chromatogr. B 764 (2001) 217–254.

*Skibińska L., Gregorczyk J., Jarmolowicz A.* (2005) HPLC Determination of methotrexate and its metabolites in blood plasma. *Chem. Anal. (Warsaw)* 50, 551.

*Sabatini L., Barbieri A., Tosi M.* i in. (2005) A new high-performance liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. *J. Mass Spectrom.* 40, 669–674.

*Surgiewicz J.* (2013) Oznaczanie frakcji wymiarowych aerozolu w świetle nowych definicji Cz. 1. Przyrządy do pobierania próbek frakcji wymiaro-

wych aerozolu zawierającego metale i ich związki. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 4(78), 5–32.

*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.

*Yoshida J., Kods S., Nishida S.* i in. (2010) Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. *J. Oncol. Pharm. Practice* 17(1) 29–38.



## PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA METOTRAKSATU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY

### 1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się w celu oznaczania stężeń metotreksatu (nr CAS: 59-05-2) w powietrzu na stanowiskach pracy, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych.

Najmniejsze stężenie metotreksatu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi 0,00007 mg/m<sup>3</sup>.

### 2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7: 2002 (wraz z późniejszą zmianą normy PN-Z-04008-7: 2002/Az1: 2004). Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

### 3. Zasada metody

Zasada metody polega na zatrzymaniu obecnego w powietrzu metotreksatu na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji zatrzymanego związku za pomocą mieszaniny metanol: woda (1: 1 v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego 0,1-procentowego, 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, nale-

ży 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. Kwas mrówkowy

Stosować według punktu 4.

#### 5.2. Metanol

Stosować metanol o czystości do LC - MS.

#### 5.3. Metotreksat

Stosować według punktu 4.

#### 5.4. Roztwór ekstrakcyjny

Sporządzić mieszaninę ekstrakcyjną przez zmieszanie metanolu i wody w stosunku 1: 1 i dodanie takiej ilości kwasu mrówkowego, aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło 0,1%.

#### 5.5. Roztwór wzorcowy podstawowy metotreksatu

Do kolby miarowej o pojemności 5 ml odważyć około 2 mg wzorca metotreksatu. Wzorzec rozpuścić roztworem ekstrakcyjnym (wg punktu 5.4.), a po rozpuszczeniu się wzorca, kolbę uzupełnić do kreski i obliczyć zawartość metotreksatu w jednym mililitrze roztworu.

#### 5.6. Roztwór wzorcowy pośredni metotreksatu

Do kolby miarowej o pojemności 10,0 ml odmierzyć pipetą (wg punktów 6.6. i 6.7) taką ilość wzorca podstawowego metotreksatu, aby

końcowe stężenie wynosiło 200 µg/ml.

#### 5.7. Roztwory wzorcowe robocze

Do siedmiu kolb miarowych o pojemności 5 ml odmierzyć pipetami (wg punktów 6.6. i 6.7) odpowiednio: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5 i 5 ml roztworu pośredniego wg punktu 5.6. Kolby uzupełnić do kreski roztworem ekstrakcyjnym (wg punktu 5.4.). Stężenia w tak przygotowanych roztworach wynoszą: 0; 5; 10; 20; 50; 100 i 200 µg/ml.

#### 5.8. Woda

Stosować wodę o czystości do HPLC.

### 6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

#### 6.1. Chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas

Stosować chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas.

#### 6.2. Filtry szklane

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

#### 6.3. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę analityczną wypełnioną fazą oktadecylową (C1-18) o średnicy ziaren 5 µm, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm.

#### 6.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności 5 i 10 ml.

#### 6.5. Naczynka szklane (wiale)

Stosować wiale o pojemności 2 i 4 ml.

#### 6.6. Pipety automatyczne nastawne

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

#### 6.7. Pipety szklane

Stosować pipety szklane jednomiarowe klasy A o pojemności: 1; 2,5 i 5 ml.

#### 6.8. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobranie próbki powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min wyposażoną w próbnik do pobierania frakcji wdychalnej pyłu.

#### 6.9. Waga analityczna

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

#### 6.10. Wytrząsarka rotacyjna

Stosować wytrząsarkę rotacyjną.

### 7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-7: 2002 (wraz z późniejszą zmianą normy PN-Z-04008-7: 2002/Az1: 2004). Za pomocą pompy (wg punktu 6.8.) przepuścić przez filtr z włókna szklanego (wg punktu 6.2.), umieszczony w oprawce umożliwiającej pobór frakcji wdychalnej, około 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe przez okres co najmniej 10 dni.

### 8. Warunki pracy chromatografu

Warunki pracy zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemowym spektrometrem mas umożliwiające selektywne oznaczenie metotreksatu w obecności innych związków podano w tabeli 1.

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

**Tabela 1.**  
**Przykładowe warunki pracy chromatografu**

Kolumna analityczna Supelcosil™ LC-18-150 x 3 mm x 5 μm	
Faza ruchoma (izokratycznie)	0,1-procentowy kwas mrówkowy w metanolu (A) ÷ 0,1-procentowy kwas mrówkowy w wodzie (B) 6 ÷ 4 (A: B)
Warunki pracy spektrometru Fragmentacja jonów: – tryb MRM ( <i>multiple reaction monitoring</i> ) Metotreksat 455,2 → 308,2	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 3/12 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

## 9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na siedem filtrów (wg punktu 6.2.) nanieść za pomocą pipety automatycznej po 10 μl roztworów wzorcowych roboczych (wg punktu 5.7.). Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml (wg punktu 6.5). Do każdej wiali dodać po 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 5.4.) i poddać 15-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki rotacyjnej (wg punktu 6.10.).

Stężenia wzorca metotreksatu w ekstraktach wynoszą odpowiednio: 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 i 1 μg/ml. Ekstrakty przenieść do naczynek o pojemności 2 ml i poddać zawartość analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych ilość wzorca naniesionego na filtr (w miligramach), a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni (wysokości) pików danego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

## 10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbek powietrza filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml, zalać 2 ml roztworu ekstrakcyjnego (wg punktu 5.4.) i poddać 15-minutowej ekstrakcji przy użyciu wytrząsarki rotacyjnej (wg punktu 6.10.). Ekstrakty przenieść do wial o pojemności 2 ml, następnie wiale szczelnie zamknąć i zawartość 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 należy uwzględnić w obliczeniach.

## 11. Obliczanie wyniku oznaczenia

Stężenie metotreksatu ( $x$ ) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny według wzoru:

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

$V$  – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

w którym:

$c$  – zawartość metotreksatu odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,