

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «АНАСТРОЗОЛ» В ВОЗДУХЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Голуб А.А., Ивашкевич Л.С.

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
Республика Беларусь г. Минск,*

Разработана селективная методика идентификации и определения массовой концентрации ингибитора ароматазы, действующего вещества противоопухолевого лекарственного средства «Анастрозол» в воздухе рабочей зоны, основанная на методе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методика чувствительна, воспроизводима и точна, что позволяет осуществлять определение анастрозола на уровне ниже регламентируемых предельно допустимых концентраций.

Ключевые слова: ингибитор ароматазы; лекарственное средство; воздух рабочей зоны; анастрозол; ВЭЖХ

ANASTRAZOL DETERMINATION IN THE AIR BY THE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Golub A.A., Ivashkevich L.S.

*Republican unitary enterprise «Scientific practical centre of hygiene»,
Belarus, Minsk*

A selective method for identification and quantitative determination of anastrozol in the workplace air, based on the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The method is sensitive, reproducible and accurate, allows to determinate anastrozol at the level below the regulated maximum permissible concentrations.

Key words: aromatase inhibitor, medical products, workplace air, anastrozol, HPLC

Анастрозол является высокоселективным нестероидным ингибитором ароматазы – содержащегося в мышцах и жировых отложениях фермента, с помощью которого у женщин андростендион и тестостерон в тканях превращается в эстрон и далее в эстрадиол. Анастрозол используется в качестве гормонотерапии диссеминированного рака молочной железы у женщин в менопаузе. Механизмом действия анастрозола, как и других ингибиторов

ароматазной активности, является блокировка эстрогенозависимого роста и деления клеток путем избирательного торможения активности цитохром Р-450-зависимого фермента ароматазы. Анастрозол вызывает выраженное угнетение ароматазной активности, ведущее к максимальному снижению уровней эстрогенов как в периферической циркуляции, так и в опухоли.

Анастрозол также был изучен на мужчинах в качестве средства для снижения эстрадиола и широко применяется в бодибилдинге.

При производстве лекарственных средств на основе анастрозола возможно его попадание в организм работающих с вдыхаемым воздухом, что при длительных воздействиях может вызывать влажлищные кровотечения, истончение волос, кожную сыпь, тошноту, диарею, головную боль, астению. В связи с этим необходима разработка и совершенствование методов определения действующего вещества в воздухе рабочей зоны при производстве и расфасовке лекарственного препарата анастрозол.

Цель работы – разработка быстрой и эффективной аналитической методики определения анастрозола в воздухе рабочей зоны на современном оборудовании с достижением высокой чувствительности, селективности и точности.

Материалы и методы. Объектами исследований явились искусственно приготовленные пробы препарата «Анастрозол», нанесенные на бумажные фильтры «синяя лента».

Действующим веществом препарата «Анастрозол» является анастрозол. Анастрозол — альфа, альфа, альфа', альфа'-Тетраметил-5-(1Н-1,2,4-триазол-1илметил)-м-бензол-диацетонитрил, молекулярная формула $C_{17}H_{19}N_5$, имеет молекулярную массу 293,4 г/моль.

Структурная формула вещества представлена на рисунке 1.

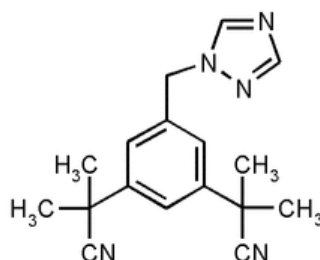


Рисунок 1. Структурная формула анастрозола

Анастрозол представляет собой белый кристаллический порошок, имеет точку плавления 81-84°C.

Вещество растворимо в воде 0,25 мг/мл (при 25°C), не зависит от рН в физиологическом диапазоне. Очень легко растворим в метаноле, этаноле, ацетоне, тетрагидрофуране. Легко растворим в ацетонитриле.

Исследования проводили методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, предполагающей использование неполярной стационарной фазы и полярных (водных)

растворителей. Измерения выполняли при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1200 (США), оснащенного диодно-матричным детектором, позволяющим проводить сканирование спектров поглощения определяемых веществ. Были использованы органические растворители хроматографической степени очистки (ацетонитрил, метанол), дистиллированная и деионизованная вода. Использовали аналитический стандарт анастрозола чистотой 99,9%. Концентрация основного стандартного раствора анастрозола в смеси: деионизованная вода – метанол HPLC grade – ацетонитрил HPLC grade в соотношении 60:30:10 составляла 100 мкг/см³. Раствор можно хранить при температуре 2-4°C в течение 3 месяцев. Промежуточный стандартный раствор анастрозола в смеси для растворения (10,0 мкг/см³) и градуировочные растворы не хранили. Градуировку проводили только с использованием водных растворов анастрозола.

Для фильтрации и дегазации компонентов мобильной фазы применяли вакуумную фильтровальную установку DURAN, оснащенную фильтрующей насадкой диаметром 47 мм, приемной колбой объемом один литр, нейлоновым мембранным фильтром диаметром 47 мм с диаметром пор 0,45 мкм (Agilent Technologies) подключенную к вакуумному насосу Rocker 300. При подборе условий отбора проб воздуха использовали автоматический пробоотборник воздуха ОП-221ТЦ с основной приведенной погрешностью задания расхода в каждой точке не более $\pm 5\%$ и основной относительной погрешностью измерения времени не больше $\pm 0,5\%$. Для фильтрации экстрактов анастрозола из бумажных фильтров «синяя лента» MN 640 d, диаметром 70 мм, № 42, производства Macherey-Nagel (Германия) использовали мембранный фильтр Econofilter 25/0,2 μm RC.

Для оценки показателя правильности разработанной методики использовались результаты проверки на незначимость отличия от единицы степени извлечения. Степень извлечения анастрозола изучали в процессе внутрилабораторных исследований в условиях повторяемости путем анализа проб с известной добавкой анастрозола. Статистические данные для оценки прецизионности получены по результатам анализа растворов с внесенным раствором анастрозола. Результаты исследований подвергались проверке на наличие выбросов с применением критерия Граббса. Наличие выбросов среди совокупности стандартных отклонений проверяли по критерию Кохрена. Расчет общего среднего значения дисперсий повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости проводился согласно правил дисперсионного анализа. Показатели прецизионности для методики были установлены следующим образом: показатель повторяемости как корень из среднего квадрата значений стандартных отклонений повторяемости, полученных для всех уровней; показатель внутрилабораторной воспроизводимости как максимальное стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости. Расчет характеристик

градуировочного графика проводили методом наименьших квадратов, были рассчитаны значения коэффициентов регрессии. Норматив стабильности градуировочного графика рассчитывался как доверительные границы для заданного содержания анастрозола в пробе. Рассчитаны относительные стандартные неопределенности, обусловленные случайными факторами и неопределенности, связанные со смещением метода.

Результаты и их обсуждение. Главными факторами, влияющими на хроматографическое поведение исследуемого препарата, являются строение молекулы вещества, его химические свойства, применяемая разделительная колонка и состав используемой подвижной фазы. В соответствии со строением – структурной формулой (рис. 1), размером молекулы определяемого вещества и его химическими свойствами для хроматографического определения анастрозола была выбрана стальная колонка обращенной фазы Hypersil BDS (неподвижная фаза – силикагель, поверхность которого была модифицирована прямыми цепочками алкильных групп C_{18} , размеры – 4,0 x 250 mm, зернение – 5 мкм, позволяющая быстро и полно разделять сложные смеси веществ), пригодная для определения различных типов веществ, в том числе лекарственных препаратов, и дающая возможность широкого выбора подвижных фаз. Для защиты колонки была установлена предколонка Hypersil BDS- C_{18} (размеры – 4 x 4 mm, зернение – 5 мкм). Таким образом, использовали следующие растворители и смеси растворителей: ацетонитрил – вода (40:60), ацетонитрил – вода (60:40), метанол – вода (80:20), метанол – вода (60:40), ацетонитрил – 0,002 % ортофосфорная кислота (50:50), метанол – 0,002 % ортофосфорная кислота (60:40), метанол – вода – ацетонитрил (40:50:10), метанол – вода – ацетонитрил (30:60:10). Скорость подвижной фазы варьировали в пределах от 0,4 до 1 мл/мин. Объем вводимой пробы изменяли от 10 до 25 мкл. Был исследован температурный режим от 20 до 45°C. Исходный стандартный раствор анастрозола готовили растворением точной навески аналитического образца вещества в подвижной фазе: деионизованная вода – метанол – ацетонитрил в соотношении 60:30:10. Рабочие стандартные растворы готовили путем соответствующего последовательного разбавления исходного стандартного раствора дистиллированной водой.

В качестве аналитического сигнала использовали площадь пика.

Идентификацию вещества проводили по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

Для установления оптимальных условий извлечения изучаемого вещества из фильтров и разведения стандартных образцов и растворов в качестве экстрагента использовали подвижную фазу.

При отработке условий отбора проб воздуха проведено испытание 3-х типов фильтров:

1) обеззоленные для анализов «синяя лента», диаметром 70 мм, производства ООО «Мелиор XXI» (Россия); 2) обеззоленные «синяя лента»

MN 640 d, диаметром 70 мм, № 42, производства Macherey-Nagel (Германия); 3) аналитические аэрозольные АФА-ВП-20-1 из фильтрующего полотна Петрянова (ФПП-15-1,5) на основе перхлорвинила с площадью рабочей поверхности 20 см², производства ОАО «Кимрская фабрика им. Горького» (Россия). В экспериментах с добавками анастрозола на фильтры в разработанных условиях хроматографирования лучшими оказались фильтры обеззолненные для анализов «синяя лента», диаметром 70 мм, производства Macherey-Nagel (Германия). Из данных фильтров анастрозол легко экстрагировался подвижной фазой под действием ультразвука, время удерживания анастрозола не совпадало с временем удерживания мешающих примесей, экстрагированных из фильтров.

В результате проведенных исследований установлены условия отбора проб воздуха.

Воздух с объёмной скоростью 20 дм³/мин протягивают в течение 20 мин с помощью аспирационного устройства через фильтр марки «синяя лента», помещенный в пластмассовый фильтродержатель. В одной точке отбирают не менее двух проб.

В качестве контроля используют чистый фильтр, обработанный аналогично пробе.

Отобранные на фильтры пробы воздуха пригодны для анализа в течение 3 суток при хранении без доступа света в сухих микроклиматических условиях.

При отборе проб одновременно измеряют температуру в месте отбора проб и атмосферное давление.

Разработаны условия хроматографирования: для разделения смеси действующего вещества анастрозола с компонентами препаративной формы в качестве подвижной фазы необходимо использовать смесь деионизованная вода – метанол – ацетонитрил в объёмном соотношении 60:30:10, при скорости подачи подвижной фазы 1,0 см³/мин.

При проведении сканирования спектров поглощения стандартных растворов анастрозола в диапазоне длин волн 210-400 нм был установлен максимум поглощения определяемого вещества. Наиболее высокая чувствительность определения достигается при длине волны 215 нм.

Оптимальный объём вводимой пробы – 20 мм³. Наилучшее разрешение пиков пробы отмечено при температуре колонки 40⁰С. При данных условиях хроматографирования ориентировочное время удерживания анастрозола – 9,1 ± 1,0 минут. Время анализа 12,0 мин. Типичная хроматограмма при выбранных условиях хроматографирования приведена на рисунке 2.

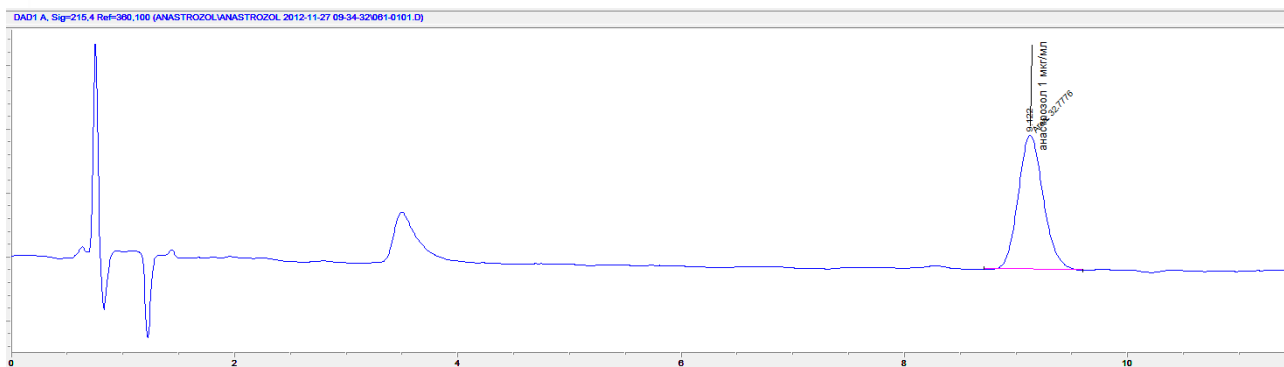


Рисунок 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора анастрозола

Концентрацию анастрозола в воздухе рабочей зоны определяют по следующей формуле:

$$X = \frac{V \cdot C}{V_1},$$

где C – концентрация анастрозола в водном растворе анализируемой пробы, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

V – объем смеси, которым проводится смывание препарата с фильтра, см³;

V_1 – объем воздуха, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям, дм³, который рассчитывается по формуле:

$$V_1 = \frac{V_t \cdot (273 + 20) P}{(273 + t) \cdot 101,3},$$

где V_t – объем исследуемого воздуха, дм³;

P – барометрическое давление во время отбора пробы, кПа;

t – температура воздуха во время отбора пробы, °С.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение концентрации анастрозола, найденное в двух пробах, отобранных в одной точке.

Заключение. На основании проведенных исследований разработана методика определения анастрозола в воздухе рабочей зоны. Методика основана на концентрировании анастрозола из воздуха на бумажные фильтры марки «синяя лента», десорбции его подвижной фазой под действием ультразвука, фильтрации через мембранный фильтр Econofilter 25/0,2 μm RC и определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно – матричного детектора при длине волны 215 нм.

Установлены метрологические характеристики методики, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности и их пределы для исследования воздуха рабочей зоны

Диапазон измерений, мг/м ³	Стандартное отклонение повторяемос	Стандартное отклонение внутрилабор.	Предел повторяемости CR _{0,95} (2), %	Предел внутрилабор. воспроизводимо

	ти σ_r , %	воспроизводимо сти σ_R , мг/м ³		сти R , мг/м ³
0,0025-0,02	0,00013	0,00159	0,00043	0,0045

При исследовании показателя правильности была признана незначимость лабораторного смещения. Максимальная расширенная неопределенность в диапазоне измеренных концентраций анастрозола от 0,0025 до 0,02 мг/м³ в воздухе рабочей зоны составляет 22,4 %.

Разработанная методика определения анастрозола в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии является селективной, чувствительной и воспроизводимой.

Список литературы

1. Методика выполнения измерений концентраций ингибитора ароматазы, действующего вещества противоопухолевого лекарственного средства «Анастрозол» в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/ разраб.: Л.С. вашкевич [и др.]; РНПЦ гигиены. – Минск, 2013. – 11 с.

2 Отчет о метрологической аттестации методики выполнения измерений концентраций анастрозола в воздухе рабочей зоны методом жидкостной хроматографии/ разраб.: Л.С. Ивашкевич [и др.]; РНПЦ гигиены. – Минск, 2013 –36 с.

3. Анастрозол [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Анастрозол>. – Дата доступа: 17.05.2019.