



Enfluran

Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografii gazowej¹

Enflurane

Determination in workplace air with gas chromatography

WIKTOR WESOŁOWSKI

<https://orcid.org/0000-0003-4047-0798>

JAKUB SMUGA

MAŁGORZATA KUCHARSKA

<https://orcid.org/0000-0001-6885-123x>

e-mail: malgorzata.kucharska@imp.lodz.pl

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

Numer CAS 13838-16-9

Streszczenie

Enfluran należy do wziewnych środków ogólnie znieczulających i jest izomerem położeniowym innego anestetyku – izofluranu. W temperaturze pokojowej jest bezbarwną, przezroczystą cieczą o słabym, słodkim zapachu. W przypadku narażenia zawodowego enfluran jest często stosowany w mieszaninie z innymi anestetykami wziewnym i dlatego objawy trudno przypisać do działania jednej substancji. U pracowników narażonych na mieszaninę anestetyków odnotowano takie objawy, jak: podrażnienie oczu i skóry, depresję ośrodkowego układu nerwowego, zaburzenia ze strony układu krążenia, uszkodzenia wątroby i nerek. Celem prac badawczych było opracowanie i walidacja metody oznaczania enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy. Opracowana metoda oznaczania enfluranu polega na adsorpcji par tej substancji na węglu aktywnym typu „Petroleum Charcoal”, ekstrakcji toluenem i analizie chromatograficznej tak otrzymanego roztworu. Do badań wykorzystano chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas (GC-MS), wyposażony w polarną kolumnę kapilarną ZB-WAXplus (o długości 60 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu fazy stacjonarnej 0,5 μm). Wskazania spektrometru mas pracującego w trybie SIM w funkcji stężenia enfluranu w badanym zakresie stężeń (10,0 ÷ 400,0 μg/ml) mają charakter liniowy. Opracowana metoda analityczna umożliwia oznaczanie enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy w obecności innych anestetyków wziewnych. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością i spełnia wymagania normy PN-EN 482 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda oznaczania enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w załączniku. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnie-

¹ Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr II.PB.02 pt. „Opracowanie metod oznaczania 12 szkodliwych substancji chemicznych w powietrzu na stanowiskach pracy do oceny narażenia zawodowego”.

Koordinator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

nia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: enfluran, metoda analityczna, powietrze na stanowiskach pracy, metoda chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

Enflurane is an inhaled general anaesthetic and is a positional isomer of another anaesthetic, namely isoflurane. At room temperature, it is a colourless, transparent liquid with a faint, sweet odour. In occupational exposure, enflurane is often used in a mixture with other inhalation anaesthetics, so symptoms are difficult to attribute to the effects of any one substance. Symptoms such as eye and skin irritation, central nervous system depression, cardiovascular disorders, and liver and kidney damage have been reported in workers exposed to anaesthetic mixtures. The aim of this research work was to develop and validate a method for the determination of enflurane in air at workplaces. This enflurane determination method is based on the adsorption of substance vapours on the 'Petroleum Charcoal' activated carbon, extraction with toluene and chromatographic analysis of the resulting solution. The tests used a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS) fitted with a capillary polar column ZB-WAXplus (60 m length, 0.25 mm diameter and 0.5 µm stationary phase film thickness). The SIM mass spectrometer readings as a function of enflurane concentration within the tested concentration range (10.0–400 µg/ml) are linear. The analytical method developed enables the determination of enflurane in air at workplaces in the presence of other inhalation anaesthetics. The method is precise and accurate and it meets the requirements of PN-EN 482 for the determination of chemicals. The method developed for the determination of enflurane in air at workplaces has been recorded as an analytical procedure (see Appendix). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering studies.

Keywords: enflurane, analytical method, air at workplaces, gas chromatographic method with mass spectrometry, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

Enfluran należy do wziewnych środków ogólnie znieczulających. W temperaturze pokojowej jest bezbarwną, przezroczystą cieczą o słabym, słodkim zapachu. Jest substancją niepalną, nie ma właściwości wybuchowych, w temperaturze pokojowej szybko odparowuje (ACGIH 2018; Black 1979; DFG 2019; GESTIS 2023). Enfluran jest najdłużej nadal stosowanym anestetykiem z grupy eterów halogenowych (halotan został już wycofany z praktyki klinicznej). Jest on izomerem położeniowym izofluranu. Obecnie jako wziewne środki znieczulające stosuje się, oprócz tlenku diazotu, halogenowane etery: sewofluran, izofluran, dezfluran, enfluran i coraz mniej popularny w anestezji u ludzi halotan. W tabeli 1 zestawiono obecnie stosowane anestetyki oraz rok ich wprowadzenia do użytku (OSHA 2000).

Enfluran nie ma klasyfikacji zharmonizowanej zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 ze zm. (rozporządzeniem Komisji (WE) nr 790/2009).

Dane dotyczące działania enfluranu uzyskano głównie od osób poddawanych narkozie stężeniami rzędu >1 MAC (*Minimal Anesthetic Concentration*). U pacjentów obserwowano przypadki złośliwej hipertermii, niedociśnienie, depresję ośrodka oddechowego i niedotlenienie, zaburzenia rytmu serca, dreszcze, nudności i wymioty, a także leukocytozę (Himmelstein i in. 2016; Khankhanian, Himmelstein 2016; RxList 2016).

Tabela 1. Stosowane anestetyki wziewne

Nazwa chemiczna/zwyczajowa	Nazwa handlowa	Rok wprowadzenia
Tlenek diazotu	podtlenek azotu	1844
Halotan	Fluothane®	1956
Enfluran	Ethane®	1974
Izofluran	Forane®	1980
Dezfluran	Suprane®	1992
Sewofluran	Ultane®	1995

W przypadku ostrego narażenia na enfluran obserwowano podrażnienie oczu, skóry i gardła. Wdychanie substancji może też powodować ból i zawroty głowy, a także senność, do utraty przytomności wyłącznie (Material Safety... 1992). Działanie przewlekłe enfluranu można obserwować u personelu medycznego pracującego w salach operacyjnych oraz gabinetach stomatologicznych i weterynaryjnych. Trudno jednak odnieść obserwowane u tych osób skutki działania do ww. substancji ze względu na narażenie personelu na mieszanie różnych anestetyków, w tym pochodnych halogenowych, takich jak halotan, izofluran, sewofluran i dezfluran, a także tlenek diazotu (N₂O). Stwierdzono, że długotrwałe działanie takiej mieszanki może powodować podrażnienie oczu i skóry, depresję ośrodkowego układu nerwowego, zaburzenia ze strony układu krążenia, a także uszkodzenia wątroby i nerek (Barker, Abdelatti 1997; CDC 2019; Grasshoff, Antkowiak 2006; McGregor 2000; Molina Aragonés i in. 2016; Rocha i in. 2015).

Na przestrzeni kilkunastu ostatnich lat nastąpiła znaczna poprawa kontroli zanieczyszczenia gazami anestetycznymi w placówkach służby zdrowia w Polsce (Kucharska, Wesołowski 2014), dzięki m.in. systematycznemu monitorowaniu narażenia zawodowego personelu medycznego i poprawie warunków pracy. Jednak dotychczas w Polsce nie monitorowano stężeń enfluranu w powietrzu sal operacyjnych ze względu na brak normatywu higienicznego dla tej substancji.

Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji ds. NDS i NDN Czynniki Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla enfluranu w powietrzu środowiska pracy na poziomie 38 mg/m³, zaś wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) nie ustalono (Kupczewska-Dobecka, Dobecki 2023).

Celem prac badawczych było przygotowanie odpowiednio czulej i selektywnej metody oznaczania enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary stężeń tego związku, a następnie dokonanie oceny narażenia zawodowego.

Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Założenia opracowanej metody

Enfluran występuje w środowisku pracy w mieszaninie z innymi anestetykami, co wskazuje na konieczność opracowania metody umożliwiającej równoczesne oznaczanie ich wszystkich. Anestetyki mają niskie temperatury wrzenia, dlatego bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego sorbentu i rozpuszczalnika do desorpcji. OSHA proponuje dwie metody. W pierwszej z nich (Shulsky 1981) do poboru próbek powietrza zastosowano węgiel z orzecha kokosowego, zaś do desorpcji disiarczek węgla (CS₂), w drugiej (Burright 1994) analogicznie – węgiel z orzech kokosowego, Anasorb CMS lub Anasorb 747, oraz CS₂. W innej metodzie opisanej przez Li i in. (2019) używano węgla aktywnego z orzecha kokosowego i dichlorometanu do desorpcji.

Wprowadzenie wartości NDS dla enfluranu oraz opracowanie metody oznaczania w powietrzu środowiska dopełnia listę wymienionych substancji wziewnych. Dla sewofluranu, izofluranu i dezfluranu opracowano metody, które są spójne tak pod względem używanego sorbentu, rozpuszczalnika, jak i rodzaju kolumny chromatograficznej (Kucharska, Wesołowski 2007; 2008; Wesołowski, Kucharska 2007). Zamierzeniem opracowywanej metody oznaczania enfluranu było zastosowanie analogicznej procedury pobierania próbek i analizy chromatograficznej jak w przypadku

pozostałych anestetyków halogenowych. We wcześniejszych badaniach sprawdzono różne rodzaje sorbentów służących do pobierania próbek powietrza, jak i rozpuszczalników do desorpcji. Najlepsze wyniki w każdym przypadku obserwowano dla układu składającego się z rurek sorpcyjnych wypełnionych węglem typu „Petroleum Charcoal” i toluenu stosowanego do desorpcji pochłoniętych substancji.

W związku z powyższym w celu oznaczenia enfluranu w warunkach narażenia zawodowego założono pobieranie próbek na węgiel aktywny, elucję toluenem, a następnie oznaczenie metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem kolumny kapilarnej w połączeniu ze spektrometrią mas.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura, materiały i odczynniki

Wszystkie badania wykonano z zastosowaniem aparatury analitycznej, materiałów i odczynników wymienionych poniżej:

- Chromatograf gazowy Agilent Technologies 7890B ze spektrometrem mas 5977A (MSD), (Agilent Technologies, Inc.) oraz dozownikiem typu MMI (MultiMode Inlet), wyposażony w polarną kolumnę kapilarną ZB-WAXplus o długości 60 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu fazy stacjonarnej 0,5 μm (Phenomenex, Inc.)
- Aspiratory niskoprzepływowe Pocket-Pump firmy SKC
- Waga analityczna firmy Sartorius.

Materiały

- Naczynka (wialki) szklane o pojemności 2 ml
- Strzykawki szklane do cieczy o pojemności 10, 50, 100, 500 i 1000 μl
- Kolby pomiarowe klasy A o pojemności: 1 i 5 ml
- Rurki sorpcyjne z syntetycznym węglem aktywnym typu „Petroleum Charcoal” (300/50 mg) o długości około 100 mm, o średnicy wewnętrznej 4 mm, zamykane kapturkami z tworzywa sztucznego.

Odczynniki

Do badań stosowano odczynniki o czystości co najmniej cz.d.a.:

- Enfluran (Sigma-Aldrich, USP®)
- Toluene (JT Baker).

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej

Warunki rozdzielania chromatograficznego dobierano tak, aby uzyskać pik enfluranu oddzielony od substancji współwystępujących, a także od pików rozpuszczalnika. Spodziewany efekt uzyskano na polarnej kolumnie ZB-WAXplus w następujących warunkach pracy aparatury:

Parametry pracy kolumny ZB-WAXplus:

- czas izotermy początkowej 2 min
- temperatura izotermy początkowej 45°C
- I szybkość przyrostu temperatury 5°C/min

- izoterma pośrednia 80°C
- czas izotermy pośredniej 0 min
- II szybkość przyrostu temperatury 20°C/min
- izoterma końcowa 180°C
- czas izotermy końcowej 1 min
- strumień objętości helu 0,9 ml/min
- ciśnienie regulowane automatycznie w trybie stałego przepływu.

Parametry dozownika typu MMI:

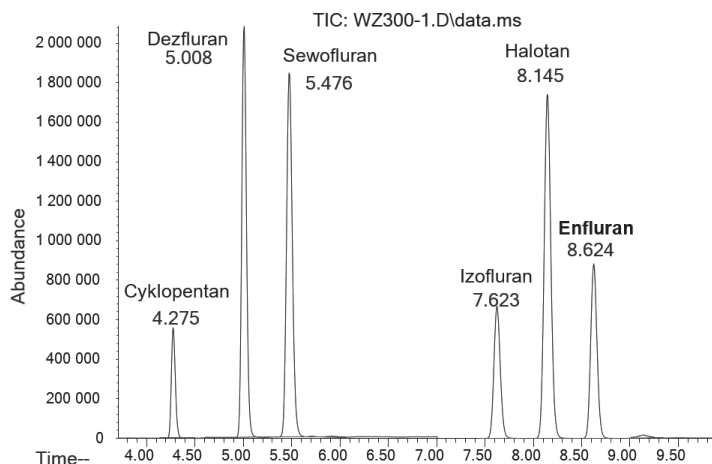
- objętość dozowanej próby 1 μl
- temperatura 200°C
- podział próbki (*split*) 50: 1
- pojemność dozownika 870 μl .

Parametry detektora MSD:

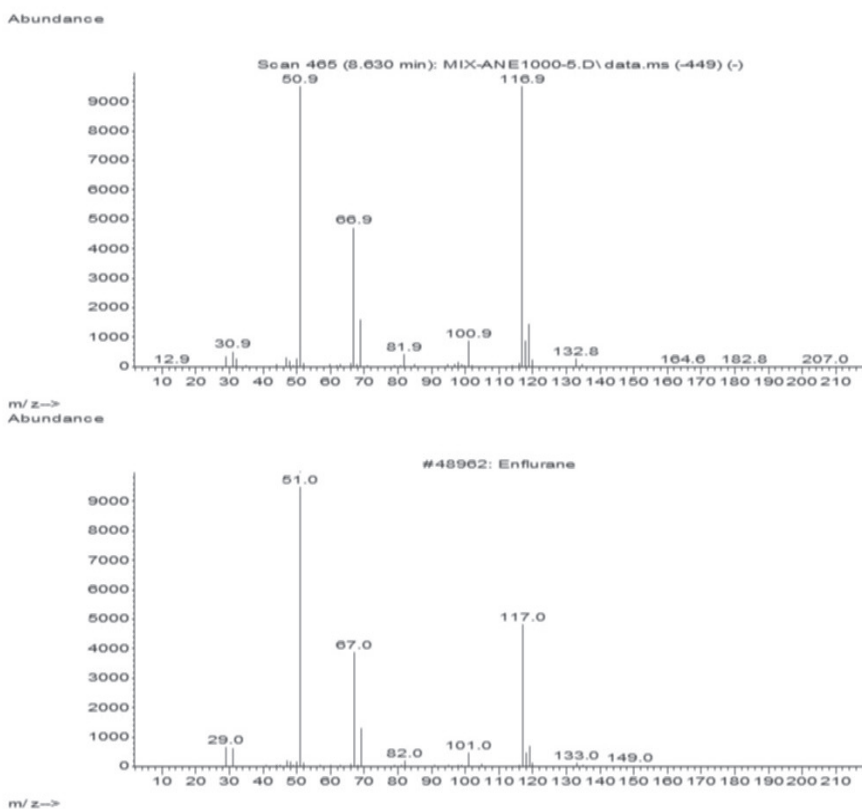
- temperatura linii transferowej 120°C
- temperatura źródła jonów 230°C
- temperatura filtra kwadrupolowego 150°C
- rodzaj jonizacji elektronami (EI)
- rejestrowane jony dodatnie
- tryb pracy SIM

- rejestrowane masy m/z: 51; 67; 69; 117 Th
- napięcie powielacza jonów w trybie „autotune” + 200 V.

Chromatogram roztworu wzorcowego enfluranu w obecności substancji współwystępujących pokazano na rycinie 1, zaś na rycinie 2 widmo mas badanego związku wraz z potwierdzeniem z biblioteki widm masowych NIST2011.



Rycina 1. Chromatogram roztworu wzorcowego, gdzie pik o czasie t_R : 4,28 min – cyklopentan (standard wewnętrzny); 5,01 min – dezfluran; 5,48 min – sewofluran; 7,62 min – izofluran; 8,15 min – halotan; 8,62 min – enfluran



Rycina 2. Widmo mas pików t_R 8,62 min (u góry rysunku) oraz widmo z wzorcowej biblioteki mas dla enfluranu (u dołu)

Zaproponowana metodyka z zastosowaniem GC-MS jest specyficzna dla enfluranu wobec innych anestetyków wziewnych, takich jak dezfluran, sewofluran, izofluran, halotan, a także toluenu stosowanego jako rozpuszczalnik i cyklopentanu – standardu wewnętrznego (ryc. 1). Dodatkowo zastosowanie spektrometru mas pozwala na identyfikację substancji na podstawie charakterystycznego widma mas (ryc. 2) w mieszaninie innych substancji.

Pobieranie próbek powietrza

W celu określenia współczynnika desorpcji badaną substancję naniesiono na węgiel aktywny typu „Petroleum Charcoal” i eluowano przy użyciu 1 ml toluenu.

Do badań przygotowano rurki sorpcyjne składające się w I sekcji z 300 mg, zaś w II sekcji 50 mg

sorbentu. Z badań przeprowadzonych na trzech poziomach stężeń (20,0; 100,0 i 200,0 µg/ml) wynika, że zastosowany układ zapewnia dobry odzysk pochłoniętego enfluranu. Wyznaczony średni współczynnik desorpcji wynosi 1,018. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2.

W kolejnym etapie badania wyznaczono maksymalną objętość próbki powietrza, jaką można pobrać bez straty analitu. W tym celu przez rurki zawierające w I warstwie 300 mg, a w II – 50 mg węgla aktywnego typu „Petroleum Charcoal”, na które naniesiono (do I warstwy) 200,0 µg enfluranu, przepuszczono znane objętości powietrza. Oznaczano zawartość enfluranu w I warstwie sorbentu i obliczano odzysk substancji po przepuszczeniu powietrza. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2. Wyznaczanie współczynnika desorpcji enfluranu z węgla z zastosowaniem toluenu

Badane parametry/Numer serii	Pole powierzchni pików enfluranu w roztworach o następującej zawartości w próbce, µg			Średnia
	20	100	200	
Roztwory badane				
I	3 359 666	16 001 929	30 952 549	
II	3 367 833	15 976 734	30 961 712	
III	3 360 481	16 010 916	31 016 957	
Średnia	3 362 660	15 996 526	30 977 073	
Odchylenie standardowe, S	4 498	17 720	34 843	
Współczynnik zmienności, CV, %	0,13%	0,11%	0,11%	0,12%
Roztwory porównawcze				
I	3 283 623	15 813 535	30 519 237	
II	3 288 198	15 817 716	30 428 945	
III	3 272 937	15 815 985	30 411 231	
Średnia	3 281 586	15 815 745	30 453 138	
Odchylenie standardowe, S	7 832	2 101	57 925	
Współczynnik zmienności, CV, %	0,24%	0,01%	0,19%	0,15%
Współczynnik desorpcji	1,025	1,011	1,017	1,018

Tabela 3. Wpływ objętości przepuszczonego powietrza na wymywanie pochłoniętego enfluranu z sorbentu

Badane parametry / Numer serii (200 µg enfluranu/próbkę)	Pole powierzchni pików enfluranu po przepuszczeniu następujących objętości powietrza, l				
	0	5	10	15	20
I	30 766 422	27 019 237	27 124 675	26 872 804	20 234 829
II	30 525 782	26 898 965	27 099 390	26 88 8693	20 221 386
III	30 394 913	26 923 646	27 163 364	26 827 263	20 104 085
IV	28 193 264	27 060 717	26 937 196	26 414 537	20 179 407
V	28 154 858	26 982 526	26 871 565	26 351 109	20 201 208
VI	28 125 555	27 038 995	26 983 688	26 363 299	20 222 347
Średnia	29 360 132	26 987 348	27 029 980	26 619 618	20 193 877
Standardowe odchylenie, S	1322 544	64 746	116 124	268 133	48 104
Współczynnik zmienności, CV, %	4,50%	0,24%	0,43%	1,01%	0,24%
Odzysk, %	100,0%	91,9%	92,1%	90,7%	68,8%

Pobranie 20 l próbki powietrza powoduje ponad 30% straty analitu. W omawianej metodzie analitycznej z zastosowaniem podanego sprzętu pomiarowego i założonego zakresu oznaczania ilościowego proponuje się pobieranie do badań 5 l powietrza. Jednak pobranie dwukrotnie większej objętości powietrza niż założona spowoduje niewielkie straty (poniżej 10%) wymywania substancji z sorbentu, a może poprawić oznaczalność metody w przypadku występowania niskich stężeń badanej substancji w środowisku pracy. Próbkę powietrza należy pobierać zgodnie z normą PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 dotyczącą zasad pobierania próbek powietrza w środowisku pracy.

Badanie zakresu stosowania, liniowości i precyzji metody analitycznej

Biorąc pod uwagę, że proponowana wartość NDS wynosi 38 mg/m^3 , i zakładając pobieranie próbki powietrza o objętości 5 l i desorpcję przy użyciu 1 ml rozpuszczalnika, a także przyjmując dolną

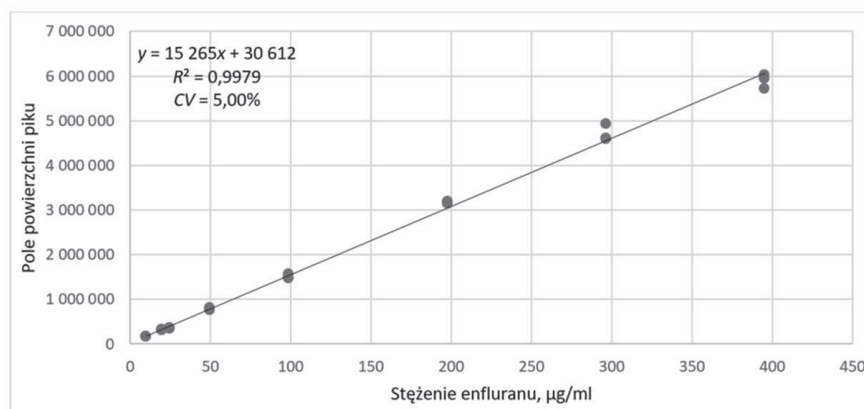
granice oznaczania ilościowego na poziomie około 1/20 NDS, najniższe stężenie oznaczanego wzorca powinno wynosić $10,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Zastosowanie wzorców o stężeniach w zakresie $10,0 \div 400,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$ pozwala objąć pełny zakres badanych stężeń w powietrzu ($1/20 \div 2$ NDS). W celu uzyskania krzywych wzorcowych sporządzono osiem roztworów enfluranu w toluenie. Stężenia enfluranu w tych roztworach wynosiły odpowiednio: 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0 i $400,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$, co przy ww. założeniach odpowiada stężeniom w powietrzu w zakresie $2,0 \div 80,0 \text{ mg/m}^3$.

Wykonano trzy serie roztworów wzorcowych, które poddano analizie chromatograficznej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 4 i na rycinie 3.

Z uzyskanych danych (tab. 3, ryc. 3) wynika, że w badanym zakresie stężeń wskazania spektrometru mas pracującego w trybie SIM w funkcji stężenia enfluranu mają charakter liniowy. Współczynnik zmienności 5,0% świadczy o dobrej powtarzalności. Dolna granica badanego zakresu stężeń $10,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$ odpowiada stężeniu enfluranu w powietrzu

Tabela 4. Badanie liniowości metody oznaczania enfluranu

Badane parametry / Numer serii	Pole powierzchni pików przy następujących stężeniach roztworów enfluranu, $\mu\text{g/ml}$							
	10	20	25	50	100	200	300	400
I	169 606	308 775	359 652	759 640	1 494 638	3 139 347	4 928 999	5 713 384
II	168 807	317 282	355 605	810 512	1 570 259	3 195 235	4 612 055	5 936 671
III	163 787	323 375	350 124	771 463	1 476 790	3 159 526	4 589 630	6 030 874
Średnie pole powierzchni pików	167 400	316 477	355 127	780 538	1 513 896	3 164 703	4 710 228	5 893 643
Współczynnik kalibracji	16 952	16 024	14 385	15 808	15 331	16 024	15 900	14 921
Odchylenie standardowe współczynnika kalibracji, S	319	371	194	539	502	143	641	413
Współczynnik zmienności, CV, %	1,88%	2,32%	1,35%	3,41%	3,28%	0,89%	4,03%	2,77%
Średni współczynnik kalibracji = 15 668								
Średnie odchylenie standardowe wsp. kalibracji, S = 390								



Rycina 3. Krzywa kalibracyjna enfluranu w zakresie $10,0 \div 400,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$

2,0 mg/m³ (przy wyżej opisanych założeniach), czyli około 1/20 proponowanej wartości NDS.

W celu oceny precyzji oznaczeń przygotowano po sześć roztworów wzorcowych enfluranu w toluenie na trzech poziomach stężeń: 20,0; 100,0 i 200,0 µg/ml. Współczynniki zmienności dla każdego z poziomów stężeń wynosiły odpowiednio: 0,34; 0,11 i 0,80%, zaś średnia precyzja zakresu pomiarowego – 0,41%. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 5.

Badanie trwałości próbek i roztworów

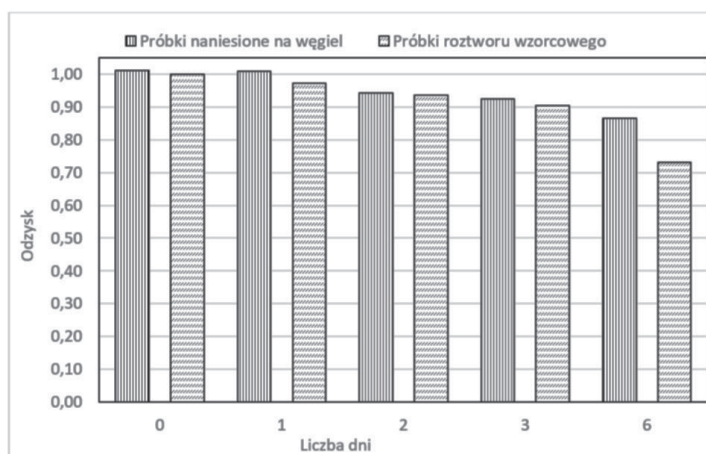
Na tym etapie badań określono trwałość roztworu podstawowego o stężeniu 10 mg/ml oraz próbek powietrza pobranych na rurki sorpcyjne. Ilość enfluranu pobranego na sorbent wynosiła 200 µg. Badany materiał (roztwór podstawowy i rurki sorpcyjne) przechowywano w zamrażarce

(w temperaturze –18°C) i analizowano w określonych odstępach czasowych, tj. po 1, 2, 3 i 6 dniach. W przypadku rurek sorpcyjnych za każdym razem z próbkami postępowano analogicznie jak w przypadku sprawdzania współczynnika desorpcji i porównywano z roztworami o takim samym stężeniu (200 µg/ml) przygotowanymi w dniu wykonywania analizy. W celu określenia trwałości roztworu podstawowego przechowywanego w zamrażarce w dniu badania przygotowano roztwór o stężeniu 200 µg/ml i porównywano z analogicznym roztworem przygotowanym na bieżąco.

Zarówno w przypadku badania trwałości próbek naniesionych na węgiel, jak i w roztworze porównywano współczynnik odzysku analitu w stosunku do roztworów o takim samym stężeniu (200 µg/ml) przygotowanych na bieżąco. Wyniki badań zestawiono na rycinie 4.

Tabela 5. Wyniki badania precyzji metody oznaczania enfluranu

Badane parametry / Numer serii	Pole powierzchni pików enfluranu w roztworach o stężeniu, µg/ml		
	20	100	200
I	3 359 666	16 001 929	30 952 549
II	3 367 833	15 976 734	30 961 712
III	3 360 481	16 010 916	31 016 957
IV	3 362 660	15 996 526	30 977 073
V	3 386 177	16 021 794	31 474 290
VI	3 382 099	16 019 697	31 435 601
Średnia	3 369 819	16 004 599	31 136 364
Odchylenie standardowe, S	11 523	16 807	248 056
Współczynnik zmienności, CV, %	0,34%	0,11%	0,80%
Średnia precyzja, średni współczynnik zmienności dla zakresu pomiarowego, %	0,41%		



Rycina 4. Badanie trwałości próbek enfluranu i podstawowego roztworu wzorcowego enfluranu o stężeniu 10 mg/ml przechowywanych w zamrażarce (–18°C)

W przypadku próbek naniesionych na węgiel i przechowywanych w zamrażarce (w temperaturze -18°C) współczynnik odzysku mieści się w zakresie od 1,01 (w pierwszym dniu) do 0,93 (w trzecim dniu). Wyniki analiz podstawowego roztworu wzorcowego wyglądają podobnie – współczynnik odzysku wynosi w pierwszym dniu przechowywania 1,00, zaś w trzecim – 0,90. Świadczy to o tym, że zarówno próbki powietrza pobrane na sorbent, jak i roztwór podstawowy o stężeniu 15 mg/ml przechowywane w zamrażarce można analizować najpóźniej w trzecim dniu od pobrania lub przygotowania.

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności (LOD) i granice oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie wyników analiz dziesięciu niezależnych pomiarów powierzchni pików o czasie retencji enfluranu dla ślepych prób. Wyniki badań zebrano w tabeli 6.

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego* (2004) i normie PN-EN 482. Obliczenia wykonano na podstawie pomiaru sygnałów tła o czasie retencji badanej substancji. Obliczone granice wykrywalności i oznaczalności wynoszą odpowiednio: $0,56$ i $1,88\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne dla metody GC-MS:

- zakres pomiarowy $10,0 \div 400,0\text{ }\mu\text{g/ml}$
($2,0 \div 80,0\text{ mg/m}^3$
dla próbki
powietrza 5 l)
- granica wykrywalności $0,56\text{ }\mu\text{g/ml}$
- granica oznaczalności $1,88\text{ }\mu\text{g/ml}$
- współczynnik korelacji $r = 0,999$
- niepewność rozszerzona metody $7,28\%$
(obliczona przy
poziomie ufności
ok. 95%
i współczynnika
rozszerzenia $k = 2$)

Tabela 6. Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności enfluranu

Wyznaczone parametry	Wartość sygnału prób ślepych (pola powierzchni pików), ($n = 10$)
	306 303
	307 106
	304 355
	309 418
	300 703
	306 603
	305 702
	308 038
	301 881
302 166	
Średnie pole powierzchni pików	305 228
Odchylenie standardowe	2 869
Współczynnik zmienności, %	0,94%
Współczynnik kierunkowy prostej wzorcowej	15 265
Granica wykrywalności, $\mu\text{g/ml}$	0,56
Granica oznaczalności, $\mu\text{g/ml}$	1,88

PODSUMOWANIE

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Wskazania spektrometru mas pracującego w trybie SIM w funkcji stężenia enfluranu w badanym zakresie stężeń (10,0 ÷ 400,0 µg/ml) mają charakter liniowy. Do pochłaniania par enfluranu z powietrza należy stosować węgiel aktywny typu „Petroleum Charcoal”, umieszczany w rurkach szklanych w ilości 300/50 mg. Enfluran jest desorbowany z węgla przy użyciu toluenu, a współczynnik desorpcji wynosi 1,02. Pobrane na proponowany sorbent próbki powietrza przechowywane w zamrażarce zachowują trwałość do 3 dni. Metoda w wersji przedstawionej w załączniku umożliwia oznaczanie enfluranu w powietrzu na stanowiskach

pracy w stężeniach od 2,0 mg/m³, czyli od około 1/20 proponowanej wartości NDS. Przedstawiona metoda umożliwia jednoczesne oznaczanie enfluranu i innych anestetyków wziewnych, takich jak sewofluran, desfluran, izofluran, halotan w jednej próbce pobranej na stanowisku pracy.

Zaproponowana metoda jest specyficzna dla enfluranu wobec ww. anestetyków, a także cyklo-pentanu i toluenu dzięki zastosowaniu polarnej kolumny ZB-WAXplus o długości 60 m, średnicy 0,25 mm, grubości filmu fazy stacjonarnej 0,5 µm. Dodatkowo analiza z zastosowaniem spektrometru mas i praca w trybie SIM z rejestracją jonów charakterystycznych dla enfluranu zapewniają identyfikację badanej substancji w mieszaninie wieloskładnikowej.

INTRODUCTION

Enflurane is an inhaled general anaesthetic. At room temperature, it is a colourless, transparent liquid with a faint, sweet odour. It is non-inflammable, non-explosive and at room temperature, it evaporates quickly (ACGIH 2018; Black 1979; DFG 2019; GESTIS 2023). Enflurane is the longest-standing halogenated ether anaesthetic still in use (halothane has already been withdrawn from clinical practice). It is an isoflurane isomer. Currently, in addition to dinitrogen oxide, the following halogenated ethers are used as inhaled anaesthetics: sevoflurane, isoflurane, desflurane, enflurane and halothane – increasingly less common in human anaesthesia. Table 1 lists the current anaesthetics and the year when they entered into use (OSHA 2000).

There is no harmonised classification for enflurane under Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/648/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Commission Regulation (EC) No 790/2009).

Data on the effect of enflurane were obtained primarily from individuals anaesthetised at concentrations >1 MAC (*Minimal Anaesthetic Concentration*). Cases of malignant hyperthermia, hypotension, respiratory depression and hypoxia, cardiac arrhythmias, chills, nausea and vomiting, as well as leucocytosis were observed in patients (Himmelstein et al. 2016; Khankhanian, Himmelstein 2016; RxList 2016).

Eye, skin and throat irritation were observed in cases of acute exposure to enflurane. Inhalation of the substance can also cause pain and dizziness, as well as drowsiness, including the loss of consciousness (Material Safety... 1992). Chronic effects of enflurane can be observed in medical personnel working in operating rooms, as well as in dentist's and veterinary practices. However, it is difficult to relate the effects observed in these individuals to these substances considering the exposure to various anaesthetics, including halogen derivatives such as halothane, isoflurane, sevoflurane and desflurane, as well as dinitrogen oxide (N₂O). It has been found that long-term exposure to such a mixture can cause eye and

Table 1. Inhaled anaesthetics in use

Chemical/Common name	Brand name	Launch year
Dinitrogen oxide	Nitrous oxide	1844
Halothane	Fluothane®	1956
Enflurane	Ethrane®	1974
Isoflurane	Forane®	1980
Desflurane	Suprane®	1992
Sevoflurane	Ultane®	1995

skin irritation, central nervous system depression, cardiovascular disorders, as well as liver and kidney injury (Barker, Abdelatti 1997; CDC 2019; Grasshoff, Antkowiak 2006; McGregor 2000; Molina Aragonés et al. 2016; Rocha et al. 2015).

Over the last decade or so, control of anaesthetic gas pollution has been significantly improved at healthcare facilities in Poland (Kucharska, Wesółowski 2014), owing to, among others, systematic monitoring of the occupational exposure of medical personnel and improved working conditions. However, concentrations of enflurane in the air in operating rooms have not been monitored in Poland due to the lack of hygienic standards for the substance.

The Team of Experts for Chemical Agents of the Inter-ministry Committee on TLV and PEL of the Occupational Hazard Agents proposed the maximum allowable concentration (threshold limit value – TLV) for enflurane in the working environment air of 38 mg/m³, and the momentary maximum permissible concentration (short-term exposure limit – STEL) was not determined (Kupczewska-Dobecka, Dobecki 2023).

The aim of the study was to develop a sufficiently sensitive and selective method for the determination of enflurane in air at workplaces, allowing for measurements of the compound concentrations, followed by an assessment of occupational exposure.

The subject matter of the article covers occupational health and safety issues, which are the subject of health sciences and environmental engineering studies.

Assumptions of the method

Enflurane is present in the working environment in mixtures with other anaesthetics, which

indicates the need to develop a method enabling simultaneous determination of all of these mixtures. Anaesthetics have low boiling temperatures, so it is very important to select the appropriate sorbent and solvent for desorption. OSHA offers two methods. In the first one (Shulsky 1981), coconut carbon was used for air sampling, while carbon disulfide (CS₂) – for desorption; in the second (Burright 1994) – coconut carbon, Anasorb CMS or Anasorb 747, and CS₂ was used. In another method described by Li et al. (2019), activated carbon from coconut and dichloromethane were used for desorption.

The introduction of the TLV for enflurane and the development of the method for determination in air will complete the list of the inhalation substances. For sevoflurane, isoflurane and desflurane, methods have been developed which are consistent in terms of sorbent, solvent and type of chromatographic column used (Kucharska, Wesółowski 2007; 2008; Wesółowski, Kucharska, 2007). The purpose of the enflurane assay method developed was to use a similar sampling and chromatographic analysis procedure as that for other halogenated anaesthetics. Previous tests have examined various types of sorbents for air sampling, as well as desorption solvents. The best results were observed in each case for a system consisting of sorption tubes filled with 'Petroleum Charcoal' carbon and toluene, used for desorption of absorbed substances.

Therefore, for the determination of enflurane under occupational exposure conditions, the sampling with activated carbon and elution with toluene was assumed, followed by gas chromatography on a capillary column coupled with mass spectrometry.

EXPERIMENTAL PART

Apparatus, materials and reagents

All the tests were performed using analytical instruments, materials and reagents listed below:

- Agilent Technologies 7890B gas chromatograph with mass spectrometer 5977A (MSD) (Agilent Technologies, Inc.) and a MMI (MultiMode Inlet) injector, fitted with a polar capillary column ZB-WAXplus, length of 60 m, 0.25 mm in diameter and 0.5 μm stationary phase thickness (Phenomenex, Inc.)
- PocketPump low flow aspirators by SKC
- Sartorius analytical balance.

Materials

- 2 ml glass containers (vials)
- Glass syringes for liquids with the capacity of 10, 50, 100, 500 and 1000 μl

- Class A volumetric flasks with a capacity of: 1 and 5 ml
- Sorption tubes with 'Petroleum Charcoal' synthetic activated carbon (300/50 mg) with a length of about 100 mm, with an inner diameter of 4 mm, closed with plastic caps.

Reagents

- At least analytically pure reagents were used for the tests:
- Enflurane (Sigma-Aldrich, USP[®])
- Toluene (JT Baker).

TEST RESULTS AND THEIR REVIEW

Choice of optimal chromatographic analysis conditions

Chromatographic separation conditions were selected so as to obtain the enflurane peak separated from the concomitant substances, as well as from the solvent peak. The expected effect was obtained on the polar column ZB-WAXplus under the following equipment operating conditions:

ZB-WAXplus column operation parameters:

- | | |
|-----------------------------------|------------|
| - starting isotherm time | 2 min |
| - starting isotherm temperature | 45°C |
| - I rate of temperature increase | 5°C/min |
| - intermediate isotherm | 80°C |
| - intermediate isotherm time | 0 min |
| - II rate of temperature increase | 20°C/min |
| - final isotherm | 180°C |
| - final isotherm time | 1 min |
| - Helium volumetric flow rate | 0.9 ml/min |

- pressure adjustable automatically in a constant flow mode.

MMI type injector parameters:

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| - volume of dispensed sample | 1 μl |
| - temperature | 200°C |
| - sample split | 50: 1 |
| - dispenser capacity | 870 μl . |

MSD detector parameters:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| - transfer line temperature | 120°C |
| - ion source temperature | 230°C |
| - quadrupole filter temperature | 150°C |
| - type of ionisation | with electrons (EI) |
| - registered ions | positive |
| - mode of operation | SIM |
| - registered mass m/z: | 51; 67; 69; 117 Th |
| - ion multiplier voltage in | 'autotune' mode + 200 V. |

The chromatogram of enflurane standard solution in the presence of concomitant substances is shown in Figure 1, and in Figure 2 – the test compound spectrum with confirmation from the NIST2011 mass spectrum libraries.

The proposed methodology using GC-MS is specific for enflurane against other inhalation anaesthetics, such as desflurane,

sevoflurane, isoflurane, halothane, and toluene used as solvent and cyclopentane as the internal standard (Figure 1). Additionally, the use of a mass spectrometer allows for identification of the substance based on the characteristic mass spectrum (Figure 2) in the mixture of other substances.

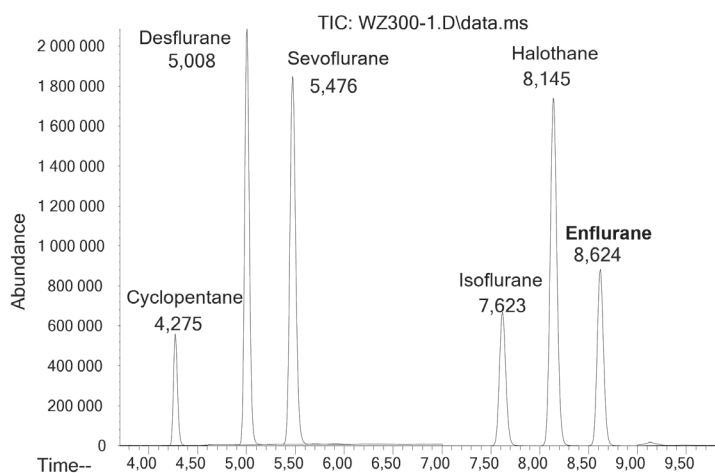


Figure 1. Chromatogram of the standard solution, where the peak with time t_R : 4.28 min – cyclopentane (internal standard); 5.01 min – desflurane; 5.48 min – sevoflurane; 7.62 min – isoflurane; 8.15 min – halothane; 8.62 min – enflurane

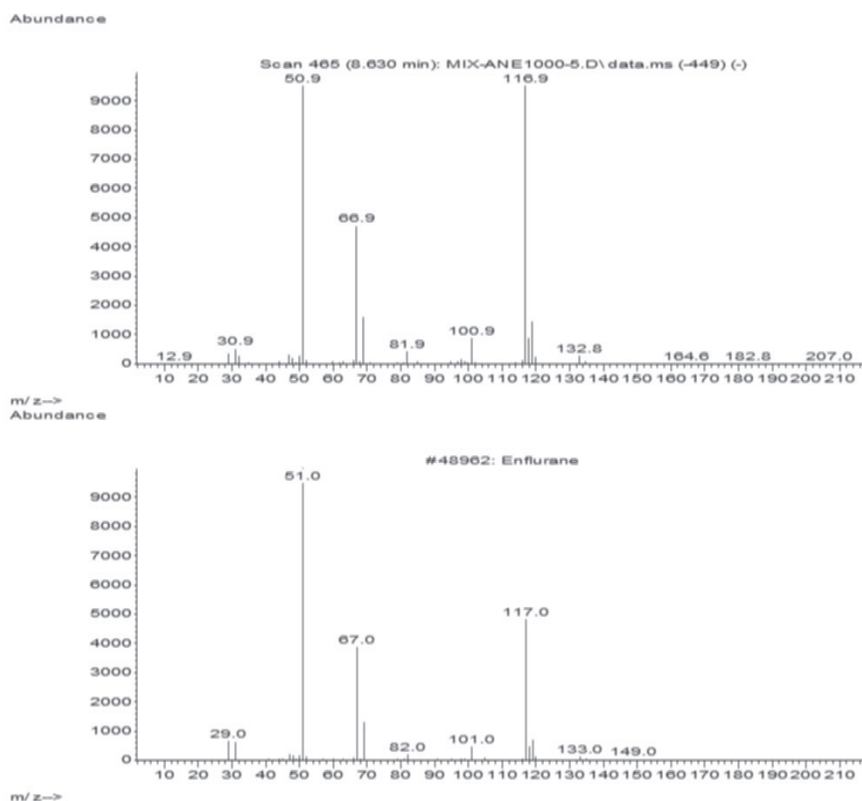


Figure 2. Mass spectrum of peak t_R 8.62 min (at the top of the diagram) and spectrum from the mass reference libraries for enflurane (at the bottom)

Collection of air samples

In order to determine the desorption coefficient, the test substance was applied to 'Petroleum Charcoal' activated carbon and eluted with 1 ml of toluene.

Sorption tubes consisting of 300 mg of the sorbent in section I and of 50 mg in section II were prepared for the tests. Tests at three concentration levels (20.0, 100.0 and 200.0 µg/ml) show that the system used provides good recovery of absorbed enflurane. The mean desorption coefficient is 1.018. The results are presented in Table 2.

At the next stage of the test, the maximum volume of air sample was determined that can be collected without the loss of analyte. For this purpose, known air volumes were passed through tubes containing 300 mg of 'Petroleum Charcoal' activated carbon in the 1st layer and 50 mg of it in the 2nd layer, with 200.0 µg enflurane applied to the 1st layer. The enflurane content in the 1st layer of the sorbent was determined and the recovery of the substance was calculated after the air passage. The test results are presented in Table 3.

Collecting a 20 l air sample results in more than 30% of the analyte loss. In this analytical method

Table 2. Determination of enflurane desorption factor from carbon with toluene

Batch number	Enflurane peak area in solutions with the following content in the sample, µg			Mean
	20	100	200	
Test solutions	I	3,359,666	16,001,929	30,952,549
	II	3,367,833	15,976,734	30,961,712
	III	3,360,481	16,010,916	31,016,957
Mean	3,362,660	15,996,526	30,977,073	
Standard deviation, S	4,498	17,720	34,843	
Coefficient of variation, CV, %	0.13%	0.11%	0.11%	0.12%
Reference solutions	I	3,283,623	15,813,535	30,519,237
	II	3,288,198	15,817,716	30,428,945
	III	3,272,937	15,815,985	30,411,231
Mean	3,281,586	15,815,745	30,453,138	
Standard deviation, S	7,832	2,101	57,925	
Coefficient of variation, CV, %	0.24%	0.01%	0.19%	0.15%
Desorption coefficient	1.025	1.011	1.017	1.018

Table 3. The effect of the passed air volume on leaching the absorbed enflurane from the sorbent

Tested parameters/Batch number (200 µg enflurane/sample)	Enflurane peak area after passing the following air volumes, l				
	0	5	10	15	20
I	30,766,422	27,019,237	27,124,675	26,872,804	20,234,829
II	30,525,782	26,898,965	27,099,390	26,888,693	20,221,386
III	30,394,913	26,923,646	27,163,364	26,827,263	20,104,085
IV	28,193,264	27,060,717	26,937,196	26,414,537	20,179,407
V	28,154,858	26,982,526	26,871,565	26,351,109	20,201,208
VI	28,125,555	27,038,995	26,983,688	26,363,299	20,222,347
Mean	29,360,132	26,987,348	27,029,980	26,619,618	20,193,877
Standard deviation, S	1,322,544	64,746	116,124	268,133	48,104
Coefficient of variation, CV, %	4.50%	0.24%	0.43%	1.01%	0.24%
Recovery, %	100.0%	91.9%	92.1%	90.7%	68.8%

using the listed measuring equipment and the assumed quantification range, collecting 5 l of air for testing is proposed. However, sampling air at a volume two times greater than assumed will result in minor losses (less than 10%) of sorbent leaching, and it can improve the method quantification level if low concentrations of the test substance are present in the working environment. Air samples should be collected in accordance with PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 concerning the rules of air sampling in the working environment.

Testing the scope, linearity and precision of the analytical method

Given that the proposed TLV is 38 mg/m³ and assuming the collection of an air sample of 5 l and desorption with 1 ml of solvent, and assuming the lower limit of quantification of approximately 1/20 TLV, the lowest concentration of the determined standard should be 10.0 µg/ml. Application of

standards at concentrations within the range of 10.0–400.0 µg/ml allows for covering the full range of the tested concentrations in the air (1/20–2 TLV). Eight enflurane solutions were prepared to obtain the calibration curves. The enflurane concentrations in these solutions were the following: 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 300.0 and 400.0 µg/ml, which corresponds to concentrations in the air within the range of 2.0–80.0 mg/m³.

Three batches of standard solutions were prepared and their chromatographic analysis was performed. The results are provided in Table 4 and Figure 3.

The data (Table 3, Figure 3) show that, within the concentration range tested, the values shown by the SIM mass spectrometer as the function of enflurane concentration are linear. A coefficient of variation of 5.0% is indicative of good repeatability. The lower limit of the tested concentration range of 10.0 µg/ml corresponds to the concentration

Table 4. Testing linearity of the enflurane assay method

Tested parameters/Batch number	Peak area at the following concentrations of enflurane solutions, µg/ml							
	10	20	25	50	100	200	300	400
I	169,606	308,775	359,652	759,640	1,494,638	3,139,347	4,928,999	5,713,384
II	168,807	317,282	355,605	810,512	1,570,259	3,195,235	4,612,055	5,936,671
III	163,787	323,375	350,124	771,463	1,476,790	3,159,526	4,589,630	6,030,874
Average area of peaks	167,400	316,477	355,127	780,538	1,513,896	3,164,703	4,710,228	5,893,643
Calibration coefficient	16,952	16,024	14,385	15,808	15,331	16,024	15,900	14,921
Standard deviation of the calibration coefficient, S	319	371	194	539	502	143	641	413
Coefficient of variation, CV, %	1.88%	2.32%	1.35%	3.41%	3.28%	0.89%	4.03%	2.77%
Mean calibration coefficient = 15 668								
Mean standard deviation of the calibration coefficient, S = 390								

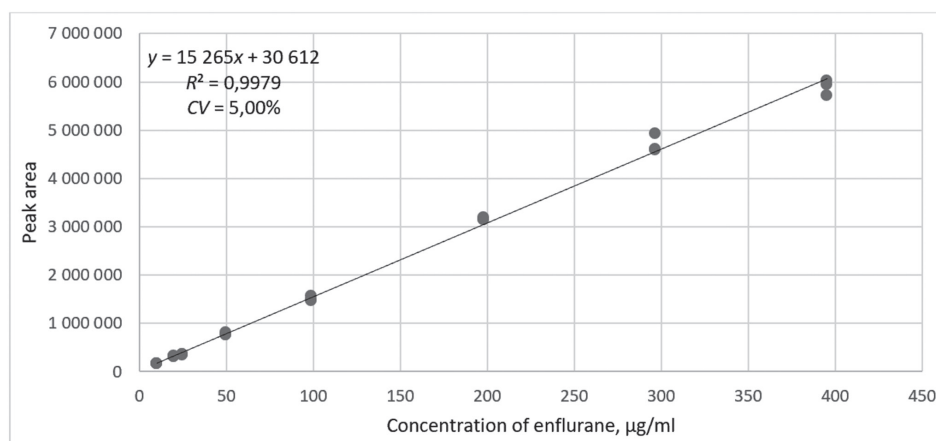


Figure 3. Enflurane calibration curve in the range from 10,0 µg/ml to 400,0 µg/ml

of enflurane in air of 2.0 mg/m³ (given the above assumptions), i.e. approximately 1/20 of the proposed TLV.

In order to assess the precision of the assays, six standard solutions of enflurane in toluene were prepared at three concentration levels: 20.0; 100.0 and 200.0 µg/ml. The coefficients of variation for each concentration level were, respectively: 0.34, 0.11 and 0.80%, and the mean precision of the measuring range – 0.41%. The results are presented in Table 5.

Stability testing of samples and solutions

The stability of the 10 mg/ml stock solution and air samples collected on the absorption tubes was determined at this stage. The amount of enflurane taken on the sorbent was 200 µg. The tested

material (stock solution and absorption tubes) was stored in a freezer (temperature –18°C) and analysed at specified time intervals, i.e. after 1, 2, 3 and 6 days. For the sorption tubes, the samples were handled in the same way as the desorption factor verification and they were compared with solutions of the same concentration (200 µg/ml) prepared on the day of the analysis. In order to determine the stability of the stock solution stored in the freezer, a solution of 200 µg/ml was prepared on the day of the test and compared with a similar solution prepared on an ongoing basis.

For both carbon-applied and in-solution stability testing, the recovery rates of the analyte were compared with solutions of the same concentration (200 µg/ml) prepared on an ongoing basis. The test results are summarised in Figure 4.

Table 5. Results of precision testing for the enflurane assay method

Tested parameters/Batch number	Peak area for enflurane in solutions with concentration, µg/ml		
	20	100	200
I	3,359,666	16,001,929	30,952,549
II	3,367,833	15,976,734	30,961,712
III	3,360,481	16,010,916	31,016,957
IV	3,362,660	15,996,526	30,977,073
V	3,386,177	16,021,794	31,474,290
VI	3,382,099	16,019,697	31,435,601
Mean	3,369,819	16,004,599	31,136,364
Standard deviation, S	11,523	16,807	248,056
Coefficient of variation, CV, %	0.34%	0.11%	0.80%
Mean precision, mean coefficient of variation for the measurement range, %	0.41%		

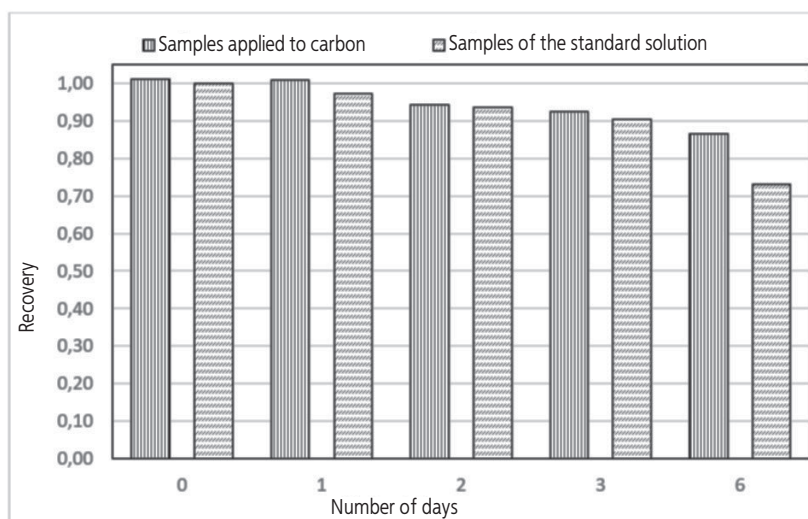


Figure 4. Stability testing for samples of enflurane and the enflurane stock standard solution at a concentration of 10 mg/ml stored in a freezer (-18°C)

For samples applied to carbon and stored in the freezer (at a temperature of -18°C) the recovery rate ranges from 1.01 (on the first day) to 0.93 (on the third day). The analysis results for the stock standard solution look similar – the recovery rate is 1.00 on the first day of storage and 0.90 on the third. This indicates that both the air samples collected on the sorbent and the stock solution at a concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stored in the freezer can be analysed on the third day after collection or preparation at the latest.

Determination of the limits of detection and quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined from the results of analyses of ten independent measurements of the peak area with the enflurane retention time for the blank samples. The test results are summarised in Table 6.

The test was conducted in accordance with the guidelines provided in *Dobecki* (2004) and PN-EN 482. The calculations were performed on the basis of background measurements with the retention time of the test substance. The calculated limits of detection and quantification are: 0.56 and 1.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

Method validation

Validation of this method was performed in accordance with PN-EN 482 standard requirements. The following validation parameters were determined for the GC-MS method:

– measurement range	10.0–400.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.0–80.0 mg/m^3 for 5 l air sample)
– limit of detection	0.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$
– limit of quantification	1.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$
– correlation coefficient	$r = 0.999$
– expanded method uncertainty	7.28% (calculated at the level of confidence $\sim 95\%$ and expansion coefficient $k = 2$)

Table 6. Determination of the limits of detection and of quantification for enflurane

The measured parameters	Blank sample signal (area of peaks) ($n = 10$)
	306,303
	307,106
	304,355
	309,418
	300,703
	306,603
	305,702
	308,038
	301,881
302,166	
Average peak area	305,228
Standard deviation	2,869
Coefficient of variation, %	0.94%
Slope of the standard straight	15,265
Limit of detection, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.56
Limit of quantification, $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.88

CONCLUSION

Using the results of the study, a method was developed for the determination of enflurane in air at workplaces using gas chromatography with mass spectrometry. The SIM mass spectrometer readings as a function of enflurane concentration within the tested concentration range (10.0–400.0 µg/ml) are linear. 'Petroleum Charcoal' activated carbon is placed in glass tubes in the amount of 300/50 mg to absorb enflurane vapours from the air. Enflurane is desorbed from carbon with toluene, and the desorption factor is 1.02. The air samples collected on the proposed sorbent, stored in the freezer, remain stable for up to 3 days. The method in the version presented in the appendix allows for determination of enflurane in air at workplaces at concentrations ranging from

2.0 mg/m³, i.e. from about 1/20 of the proposed TLV. This method allows for simultaneous determination of enflurane and other inhalation anaesthetics such as sevoflurane, desflurane, isoflurane, halothane in one sample collected at a workplace.

The proposed method is specific for enflurane against the above-mentioned anaesthetics, as well as cyclopentane and toluene due to the use of polar ZB-WAXplus column with a length of 60 m, diameter 0.25 mm, stationary phase thickness 0.5 µm. In addition, the analysis with a mass spectrometer and SIM mode operation with enflurane-specific ions registration ensures identification of the test substance in the multi-component mixture.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2018). 7th Edition of Chemical Substances Documentation of Treshold Limit Value Documentation. Enflurane (2001) [on CD]. Cincinnati, Ohio: The Governmental Organisation.

Barker J.P., Abdelatti M.O. (1997). Anaesthetic pollution: potential sources, their identification and control. *Anaesthesia* 52, 1077–1083.

Black G.W. (1979). Enflurane. *Br. J. Anaesth.* 51, 627.

Burright D. (1994). Method no. 103. Enflurane, halothane, isoflurane. Organic Methods Evaluation Branch. OSHA Salt Lake City Technical Center, Salt Lake City, Utah.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2019). NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. Enflurane, <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0253.html> [dostęp/available: 10.11.2022].

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft (2019). Deutsche Forschungsgemeinschaft MAK- und BAT-Werte-Liste 2019: Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Mitteilung 55. WILEY-VCH.

Dobecki M. (2004). Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Wydanie III poprawione. IMP, Łódź.

GESTIS (2023). GESTIS Substance Database, <https://gestis-database.dguv.de/data?name=510432> [dostęp/available: 10.11.2022].

Grasshoff C, Antkowiak B. (2006). Effects of isoflurane and enflurane on GABAA and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *Br. J. Anaesth.* 97(5), 687–694.

Himmelstein D., Lizee A., Hessler Ch. i in. (2016). Report. Rephetio: Repurposing drugs on a hetnet. Thinklab, <https://think-lab.github.io/p/rephetio/report/> [dostęp/available: 10.11.2022].

Khankhanian P., Himmelstein D. (2016). Prediction in epilepsy. Rephetio: Repurposing drugs on a hetnet. Thinklab, <https://think-lab.github.io/d/224/> [dostęp/available: 10.11.2022].

Kucharska M., Wesółowski W. (2007). Izofluran – metoda oznaczania [Isoflurane – determination]. *Podst. Met. Oceny Srodow.* Pr. 1(51), 133–139.

Kucharska M., Wesółowski W. (2008). Sewofluran – metoda oznaczania [Sevoflurane – determination]. *Podst. Met. Oceny Srodow.* Pr. 1(55), 49–55.

Kucharska M., Wesółowski W. (2014). Ocena narażenia zawodowego personelu medycznego na anestetyki wziewne w Polsce [Assessment of occupational exposure of medical personnel to inhalatory anesthetics in Poland]. *Med. Pr.* 65(1), 43–54.

Kupczewska-Dobecka M., Dobecki M. (2023). Enfluran. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego [Enflurane. Documentation of

- proposed values of occupational exposure limits (OELs)]. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(115), 45–89.
- Li T.D., Zhang W., Cai J. M. i in. (2019). [Determination of sevoflurane, isoflurane and enflurane in the air of workplace by gas chromatography]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* [Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases] 37(6), 453–456.
- Material Safety Data Sheet (1992). *Material Safety Data Sheet: Ethrane*. Anaquest, Liberty Corner, New Jersey.
- McGregor D.G. (2000). Occupational exposure to trace concentrations of waste anesthetic gases. *Mayo Clin. Proc.* 75(3), 273–277.
- Molina Aragonés J.M., Ayora Ayora A., Barbara Ribalta A. i in. (2016). Occupational exposure to volatile anaesthetics: a systematic review. *Occup. Med. (Lond.)* 66, 202–207.
- OSHA, Occupational Safety and Health (2000). *Anesthetic gases: guidelines for work place exposures*. Washington, DC: U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. <https://www.osha.gov/waste-anesthetic-gases/workplace-exposures-guidelines> [dostęp/available: 10.11.2022].
- PN-EN 482+A1:2016-01 *Narażenie na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych* [Workplace exposure – General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents].
- PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004 *Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników*.
- Rocha T.L., Dias-Junior C.A., Possomato-Vieira J.S. i in. (2015). Sevoflurane induces DNA damage whereas isoflurane leads to higher antioxidative status in anesthetized rats. *Biomed. Res. Int.* 264971. DOI: 10.1155/2015/264971.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji oraz mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 z dnia 31.12.2008 r. *Dz. Urz. WE L 353*, 1–1355, ze zm. [Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substance and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006].
- RxList (2016). RxList information on medications. WebMD Consumer Network: The Internet Drug Index. *Ethane (Enflurane) Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning*. <https://www.rxlist.com/ethrane-drug.htm#precautions> [dostęp/available: 1.03.2016].
- Shulsky M. (1981). Method no. 29. Enflurane and halothane. *Organic Methods Evaluation Branch. OSHA Analytical Laboratory, Salt Lake City, Utah*.
- Wesołowski W., Kucharska M. (2007). *Dezfluran – metoda oznaczania* [Desflurane – determination]. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(51), 113–119.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA ENFLURANU W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY Z ZASTOSOWANIEM CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się do oznaczania stężeń enfluranu w powietrzu na stanowiskach pracy. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarno-epidemiologicznych.

W przypadku współwystępowania w badanym powietrzu innych związków organicznych należy sprawdzić, czy w warunkach wykonywania oznaczania nie mają one takich samych czasów retencji jak enfluran.

Najmniejsze stężenie enfluranu, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonywania oznaczania opisaną metodą GC-MS, wynosi 2,0 mg/m³ powietrza.

2. Powołania normatywne

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

3. Zasada metody

Metoda polega na zatrzymaniu par enfluranu na węglu aktywnym typu „Petroleum Charcoal”, desorpcji toluenem i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Do analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki i substancje wzorcowe o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do 0,0002 g.

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności związane z odważaniem substancji wzorcowych powinny odbywać się z użyciem rękawic i odzieży ochronnej. Czynności,

podczas których używa się rozpuszczalników organicznych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem.

Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich unieszkodliwianiem.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Enfluran

Stosować wg rozdziału 4.

5.2. Toluen

Stosować wg rozdziału 4.

5.3. Gazy sprężone do chromatografu

Jako gaz nośny do chromatografu stosować hel.

5.4. Roztwór wzorcowy podstawowy enfluranu
Kolbę miarową o pojemności 1 ml wypełnić do połowy toluenem wg punktu 5.2, zważyć, używając wagi wg punktu 6.8, następnie dodać około 10 mg enfluranu (6,6 µl wzorca), ponownie zważyć w celu określenia rzeczywistej ilości wzorca, a następnie zawartość kolby uzupełnić do kreski toluenem wg punktu 5.2. Obliczyć stężenie enfluranu w roztworze.

Roztwór wzorcowy podstawowy (RWB) przechowywany w zamrażarce, w szczelnie zamkniętej kolbie, zachowuje trwałość przez 3 dni.

5.5. Roztwór wzorcowy pośredni enfluranu

Kolbę miarową o pojemności 5 ml wypełnić do połowy toluenem wg punktu 5.2, dodać 500,0 µl roztworu wzorcowego (RWB) wg punktu 5.4, a następnie zawartość kolby uzupełnić do kreski toluenem wg punktu 5.2. Uzyskany w ten sposób roztwór wzorcowy pośredni (RWP) ma stężenie około 1000 µg/ml (dokładne stężenie należy wyliczyć na podstawie stężenia roztworu wzorcowego podstawowego).

5.6. Roztwory wzorcowe robocze enfluranu

W celu przygotowania roztworów wzorcowych roboczych do ośmiu kolb miarowych o pojemności 1 ml odmierzyć kolejno następujące objętości

roztworu wzorcowego pośredniego (RWP) wg punktu 5.5, w mikrolitrach: 10, 20, 25, 50, 100, 200, 300 i 400, następnie uzupełnić do kreski toluenem wg punktu 5.2, szczelnie zamknąć i wymieszać. Zawartość enfluranu w 1 ml tych roztworów wynosi odpowiednio, w mikrogramach: 10, 20, 25, 50, 100, 200, 300 i 400, co po pobraniu próbki powietrza o objętości 5 l odpowiada stężeniom $2,0 \div 80,0 \text{ mg/m}^3$.

Roztwory wg punktu 5.5 i 5.6 są nietrwałe i należy je przygotowywać w dniu wykonywania analizy.

5.7. Węgiel aktywny

Stosować węgiel aktywny typu „Petroleum Charcoal”. Proponowany sorbent jest gotowy do użytku. Dla każdej partii sorbentu należy każdorazowo wyznaczyć współczynnik desorpcji wg rozdziału 12.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf gazowy ze spektrometrem mas

Stosować chromatograf gazowy ze spektrometrem mas, z programem akwizycji danych, sterowaniem parametrami spektrometru i chromatografu, bibliotekami wzorcowych widm mas oraz komputerem.

6.2. Kolby

Stosować kolby miarowe o pojemności 1 i 5 ml.

6.3. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną zapewniającą rozdzielanie enfluranu od toluenu i innych anestetyków występujących jednocześnie w powietrzu, np. polarną kolumnę długości 60 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,5 μm .

6.4. Mikrostrzykawki

Stosować szklane mikrostrzykawki z igłą do cieczy, o pojemności, w mikrolitrach: 10, 50, 100, 500 i 1000.

6.5. Naczynka

Stosować naczynka szklane o pojemności 2 ml z nakrętkami wyposażonymi w zawory i uszczelki silikonowe umożliwiające pobieranie roztworu bez otwierania naczynka.

6.6. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobieranie powietrza ze stałym strumieniem objętości wg rozdziału 7. Zaleca się stosowanie pomp do dozymetrii indywidualnej.

6.7. Rurki pochłaniające

Stosować rurki pochłaniające szklane, długości około 100 mm, o średnicy wewnętrznej 4 mm, z przewężeniem na jednym końcu, zamykane kapturkami z tworzywa sztucznego, np. polietylenu, polichlorku winylu.

6.8. Waga

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

7. Przygotowanie rurek pochłaniających

W rurce pochłaniającej wg punktu 6.7 umieścić na przewężeniu, w dłuższej części rurki, przegródkę z pianki poliuretanowej lub włókna szklanego grubości około 2 mm. Wsypać 50 mg sorbentu wg punktu 5.7, umieścić na nim przegródkę, następnie wsypać 300 mg sorbentu i ponownie umieścić przegródkę. Natychmiast po napełnieniu rurkę zamknąć zatyczkami. Dopuszcza się stosowanie gotowych rurek pochłaniających dostępnych w handlu.

8. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać wg PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbki powietrza przez rurkę pochłaniającą przygotowaną wg rozdziału 7 przepuścić 5 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 3 l/h. Pobrane próbki przechowywane w zamrażarce zachowują trwałość przez 3 dni.

9. Warunki pracy chromatografu

Optymalne warunki analizy uzyskuje się przy następujących parametrach pracy chromatografu:

Parametry pracy kolumny ZB-WAXplus:

- czas izotermy początkowej 2 min
- temperatura izotermy początkowej 45°C
- I szybkość przyrostu temperatury 5°C/min
- izoterma pośrednia 80°C
- czas izotermy pośredniej 0 min
- II szybkość przyrostu temperatury 20°C/min
- izoterma końcowa 180°C
- czas izotermy końcowej 1 min

- strumień objętości helu 0,9 ml/min
- ciśnienie regulowane automatycznie w trybie stałego przepływu.

Parametry dozownika typu MMI:

- objętość dozowanej próby 1 μ l
- temperatura 200°C
- podział próbki (*split*) 50: 1
- pojemność dozownika 870 μ l.

Parametry detektora MSD:

- temperatura linii transferowej 120°C
- temperatura źródła jonów 230°C
- temperatura filtra kwadropolowego 150°C
- rodzaj jonizacji elektronami (EI)
- rejestrowane jony dodatni
- tryb pracy SIM
- rejestrowane masy m/z: 51; 67; 69; 117 Th
- napięcie powielacza jonów w trybie „autotune” + 200 V.

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić po 1 μ l roztworów wzorcowych roboczych enfluranu wg punktu 5.6. Z każdego roztworu wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików z uzyskanych chromatogramów i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość enfluranu w roztworach, w mikrogramach, a na osi rzędnych odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się korzystanie z automatycznego wzorcowania i generowania raportów z integratorów lub komputerowych stacji akwizycji danych zgodnie z ich instrukcjami obsługi.

11. Wykonanie oznaczania

Po pobraniu próbki powietrza wg rozdziału 8 przesypać oddzielnie każdą warstwę węgla aktywnego z rurki pochłaniającej przygotowanej wg rozdziału

7 do naczynek wg punktu 6.5. Do naczynek dodać po 1 ml toluenu wg punktu 5.2. Naczynka pozostawić szczelnie zamknięte przez 30 min, wstrząsając co pewien czas ich zawartością. Następnie wykonać oznaczenie chromatograficzne roztworu znad dłuższej warstwy węgla aktywnego w warunkach wg rozdziału 9. Z każdego roztworu wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnię pików z uzyskanych chromatogramów i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami pomiarów a wartością średnią nie powinna być większa niż 5% wartości średniej. Zawartość enfluranu, w mikrogramach, w badanym roztworze odczytać z krzywej wzorcowej.

W taki sam sposób wykonać oznaczenie zawartości enfluranu w roztworze znad krótszej warstwy węgla aktywnego. Zawartość enfluranu oznaczana w krótszej warstwie węgla aktywnego nie powinna przekraczać 10% zawartości oznaczanej w dłuższej warstwie węgla. W przeciwnym wypadku wynik należy traktować jako orientacyjny.

12. Wyznaczanie współczynnika desorpcji

Do pięciu naczynek wg punktu 6.5 wsypać po 300 mg węgla aktywnego, tj. w ilości odpowiadającej dłuższej warstwie w rurce pochłaniającej przygotowanej wg rozdziału 7. Następnie dodać mikrostrzykawką po 20 μ l roztworu wzorcowego podstawowego enfluranu wg punktu 5.4. W szóstym naczynku przygotować roztwór kontrolny zawierający tylko dłuższą warstwę węgla aktywnego. Naczynka szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Po tym czasie wprowadzić do naczynek po 1 ml roztworu do elucji wg punktu 5.5. Przed wykonaniem oznaczania chromatograficznego roztworu co pewien czas wstrząsać zawartością naczynek w ciągu 30 min.

Jednocześnie wykonać oznaczenie enfluranu co najmniej w trzech roztworach porównawczych przygotowanych przez wprowadzenie 20 μ l roztworu wzorcowego podstawowego enfluranu wg punktu 5.4 do naczynek zawierających po 1 ml toluenu wg punktu 5.2.

Tak uzyskane roztwory badać chromatograficznie w warunkach wg rozdziału 9.

Współczynnik desorpcji enfluranu (*d*) obliczyć wg wzoru:

$$d = \frac{(P_d - P_o)}{P_p}$$

w którym:

P_a – średnia powierzchnia pików enfluranu z chromatogramów roztworu po desorpcji,

P_o – średnia powierzchnia pików o czasach retencji enfluranu z chromatogramów roztworu kontrolnego,

P_p – średnia powierzchnia pików enfluranu z chromatogramów roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynnika desorpcji enfluranu (\bar{d}) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości. Różnice między wynikami a wartością średnią nie powinny być większe niż $\pm 5\%$ tej wartości. Współczynnik desorpcji należy zawsze wyznaczać dla nowej partii sorbentu wg punktu 5.7.

13. Obliczanie wyniku oznaczenia

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

$$X = \frac{m_1 + m_2}{V \cdot \bar{d}}$$

w którym:

m_1 – zawartość enfluranu w roztworze znad dłuższej warstwy węgla aktywnego, odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,

m_2 – zawartość enfluranu w roztworze znad krótszej warstwy sorbentu, odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach,

V – objętość powietrza przepuszczonego przez rurkę pochłaniającą, w litrach,

\bar{d} – średnia wartość współczynnika desorpcji oznaczona wg rozdziału 12.

ANALYTICAL PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF ENFLURANE IN THE AIR AT WORKPLACES USING GAS CHROMATOGRAPHY

1. Scope of application of the method

The method specified in this procedure is applied to determine concentrations of enflurane in air at workplaces. It is used when testing sanitary and epidemiological conditions.

For the co-occurrence of other organic compounds in the tested air, it should be checked whether they have the same retention times as enflurane under the test conditions.

The lowest enflurane concentration that can be determined under the conditions of air sampling and determination by the GC-MS method is 2.0 mg/m³ of air.

2. Normative references

PN-Z-04008-7 Air purity protection – Sampling – Rules for sampling air in the working environment and interpretation of the results.

3. Method principle

The method involves adsorbing enflurane vapours on 'Petroleum Charcoal' activated carbon, desorption with toluene and chromatographic analysis of the resulting solution.

4. General guidelines

4.1. Reagent purity

At least analytical grade reagents and standard substances should be used for the analysis, unless otherwise stated.

4.2. Weighing accuracy

The substances used in the analysis should be weighed to the accuracy of 0.0002 g.

4.3. Handling toxic substances

All the standard substance weighing activities should be performed using gloves and protective clothing. Operations involving the use of organic solvents should be carried out under a well-functioning laboratory fume hood.

Used solutions and reagents should be collected in special containers and transferred to disposal facilities.

5. Reagents, solutions and materials

5.1. Enflurane

Use as set out in Chapter 4.

5.2. Toluene

Use as set out in Chapter 4.

5.3. Compressed gases for chromatograph

Use helium as a chromatograph carrier gas.

5.4. Standard enflurane stock solution

Pour toluene to half of the capacity of a 1 ml volumetric flask as per Section 5.2, weigh using the balance as described in Section 6.8, then add ca. 10 mg enflurane (6.6 µl of the standard), weigh again to determine the actual amount of the standard, and then make up to the mark with toluene as described in Section 5.2. Calculate the concentration of enflurane in the solution.

The stock standard solution kept in a freezer in a tightly closed flask remains stable for 3 days.

5.5. Standard intermediate enflurane solution

Pour toluene to half of the capacity of a 5 ml volumetric flask as per Section 5.2, add 500.0 µl of the standard solution as per Section 5.4, and then make up to the mark with toluene as described in Section 5.2. The resulting intermediate standard solution has a concentration of approximately 1,000 µg/ml (the exact concentration should be calculated from the concentration of the stock standard solution).

5.6. Enflurane working standard solutions

In order to prepare working standard solutions, measure the following volumes of intermediate standard solution to eight 1 ml volumetric flasks as per Section 5.5, in microlitres: 10, 20, 25, 50, 100, 200, 300 and 400, then make up to the mark with toluene according to Section 5.2, close tightly and mix. Enflurane content in 1 ml of these solutions is, in micrograms, respectively: 10, 20, 25, 50, 100,

200, 300 and 400, which – after a 5 l air sample collection – corresponds to 2.0–80.0 mg/m³.

Solutions made according to Sections 5.5 and 5.6 are unstable and should be prepared on the day of analysis.

5.7. Activated carbon

Use 'Petroleum Charcoal'-type activated carbon. The proposed sorbent is ready for use. For each batch of the sorbent, the desorption factor should be determined each time as per Chapter 12.

6. Measuring instruments and auxiliary equipment

6.1. Gas chromatograph with mass spectrometer

Use a gas chromatograph with mass spectrometer, with a data acquisition program, control of spectrometer and chromatograph parameters, standard mass spectra libraries and a computer.

6.2. Flasks

Use 1 and 5 ml volumetric flasks.

6.3. Chromatographic column

Use a chromatographic column which ensures separation of enflurane from toluene and other anaesthetics simultaneously present in air, e.g. a 60 m polar column, inner diameter 0.25 mm and 0.5 µm film thickness.

6.4. Micro-syringes

Use glass micro-syringes with a needle for liquid, with the capacity – in microlitres: 10, 50, 100, 500 and 1000.

6.5. Containers

Use 2 ml glass containers with screw caps with valves and silicone seals for collecting solution without opening the container.

6.6. Suction pump

Use a suction pump for air intake with a constant volumetric flow rate as per Chapter 7. Individual dosimetry pumps are recommended.

6.7. Absorbent tubes

Use glass absorbent tubes, approximately 100 mm long, with an inner diameter of 4 mm, with a narrowing at one end, closed with plastic caps, e.g. made of polyethylene, polyvinyl chloride.

6.8. Balance

Use an analytical balance with an accuracy of 0.0002 g.

7. Preparation of absorbent tubes

Place a partition made of polyurethane foam or fibreglass, approximately 2 mm thick, in the

absorbing tube as described in Section 6.7, at the narrowing, in the longer part of the tube. Pour in 50 mg of sorbent as per Section 5.7, place the partition on it, then pour in 300 mg of sorbent and re-insert the partition. Close the tube with the caps immediately after filling. Ready-made absorbent tubes may be used.

8. Collection of air samples

Air samples should be collected in accordance with PN-Z-04008-7. Pass 5 l of tested air at a constant flow rate of not more than 3 l/h at the air sampling site through the absorbent tube prepared according to Chapter 7. Collected samples kept in the freezer remain stable for 3 days.

9. Chromatograph operating conditions

The optimal analysis conditions are achieved with the following chromatograph operating parameters:

ZB-WAXplus column operation parameters:

- starting isotherm time 2 min
- starting isotherm temperature 45°C
- I rate of temperature increase 5°C/min
- intermediate isotherm 80°C
- intermediate isotherm time 0 min
- II rate of temperature increase 20°C/min
- final isotherm 180°C
- final isotherm time 1 min
- Helium volumetric flow rate 0.9 ml/min
- pressure adjustable automatically in the constant flow mode.

MMI type injector parameters:

- volume of dispensed sample 1 µl
- temperature 200°C
- sample split 50: 1
- dispenser capacity 870 µl.

MSD detector parameters:

- transfer line temperature 120°C
- ion source temperature 230°C

- quadrupole filter temperature 150°C
- type of ionisation with electrons (EI)
- registered ions positive
- mode of operation SIM
- registered mass m/z: 51; 67; 69; 117 Th
- ion multiplier voltage in mode ‘autotune’ + 200 V.

10. Drawing up a calibration curve

Transfer 1 µl of enflurane working standard solutions to the chromatograph according to Section 5.6. Two measurements are performed for each solution. Read the peak areas from the chromatograms and calculate the arithmetic mean. The difference between the results and the mean value should not be greater than 5% of the mean value. Then plot the calibration curve, marking the enflurane content in the solutions, in micrograms, on the X axis, and the corresponding mean peak areas – on the Y axis.

It is possible to use automatic calibration and to generate reports from integrators or computerised data acquisition stations in accordance with their operating instructions.

11. Determination

After collecting an air sample according to Chapter 8, transfer separately each layer of activated carbon from the absorbent tube prepared according to Chapter 7 to the containers according to Section 6.5. Add 1 ml of toluene each to the container according to Section 5.2. Leave the containers tightly closed for 30 minutes, shaking their contents every now and then. Then perform chromatographic assay of the solution from above the longer layer of activated carbon under conditions as per Chapter 9. Two measurements are performed for each solution. Read the peak area from the chromatograms and calculate the arithmetic mean. The difference between the results and the mean value should not be greater than 5% of the mean value. Read the enflurane content in the test solution in micrograms from the calibration curve.

In the same way, perform an enflurane assay in a solution from above the shorter layer of activated

carbon. The enflurane content determined in the shorter layer of activated carbon should not exceed 10% of the content determined in the longer carbon layer. Otherwise, the result should be regarded as approximate.

12. Determination of desorption factor

Add 300 mg of activated carbon to each of five containers as per Section 6.5, i.e. an amount corresponding to the longer layer in the absorbent tube prepared according to Chapter 7. Subsequently add with a micro-syringe 20 µl of the enflurane stock standard solution as per Section 5.4. In the sixth container, prepare a reference solution containing only the longer layer of activated carbon. Close the container tightly and leave it until the next day. After that time, transfer 1 ml of the elution solution to each of the containers as per Section 5.5. Shake the contents of the containers every now and then during 30 minutes before chromatographic analysis of the solution.

At the same time, perform enflurane assay in at least three reference solutions prepared by adding 20 µl of the enflurane stock standard solution as per Section 5.4 to the containers containing 1 ml of toluene as per Section 5.2.

Analyse the obtained solutions chromatographically as per Chapter 9.

Calculate the desorption factor for enflurane (*d*) with the following formula:

$$d = \frac{(P_d - P_o)}{P_p}$$

where:

- P_d – mean area of enflurane peaks on the chromatograms of the solution after desorption,
- P_o – mean area of peaks with enflurane retention times on the chromatograms of the control solution,
- P_p – mean area of enflurane peaks on the chromatograms of reference solutions.

Then calculate the mean value of the enflurane desorption coefficient (\bar{d}) as the arithmetic mean of the calculated values. The difference between the results and the mean value should not be greater than ±5% of the mean value. The desorption coefficient should always be determined for a new batch of the sorbent according to Section 5.7.

13. Calculation of the determination result

Calculate the enflurane concentration (X) in the air, in milligrams per cubic meter, according to the formula:

$$X = \frac{m_1 + m_2}{V \cdot \bar{d}}$$

where:

- m_1 – enflurane content in solution from above a longer layer of activated carbon, read from the calibration curve, in micrograms,
- m_2 – enflurane content in the solution from above the shorter layer of sorbent, read from the calibration curve, in micrograms,
- V – the volume of air passed through the absorbent tube, in litres,
- \bar{d} – mean desorption coefficient value determined according to Chapter 12.

Adres do korespondencji/Contact details:

MAŁGORZATA KUCHARSKA
e-mail: malgorzata.kucharska@imp.lodz.pl
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8
POLAND