

dr MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA
mgr ANNA OSYTEK
dr MAŁGORZATA POŚNIAK
dr inż. MAGDALENA GALWAS-
-GRZESZKIEWICZ
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

N-Hydroksymocznik

– metoda oznaczania

Słowa kluczowe: N-Hydroksymocznik, analiza powietrza, stanowisko pracy, substancje farmaceutyczne, wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Keywords: air analysis, workplace, high performance liquid chromatography.

Metodę stosuje się do oznaczania stężeń N-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy podczas przeprowadzania kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Metoda polega na zatrzymaniu N-hydroksymocznika na filtrze z włókna szklanego, wmywaniu analitu wodą destylowaną oraz analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

Oznaczalność metody wynosi 0,001 mg/m³.

UWAGI WSTĘPNE

N-Hydroksymocznik należy do grupy cytostatyków (tab. 1.) o działaniu antymitotycznym polegającym na hamowaniu syntezy DNA przez zmniejszenie aktywności reduktazy rybonukleinowej. N-Hydroksymocznik powoduje zatrzymanie wzrostu komórek w interfazie G1-S, co jest istotne dla prowadzonej jednocześnie radioterapii, ze względu na wrażliwość komórek na promieniowanie w fazie G1. Lek działa głównie na szpik, hamując w pierwszym rzędzie granulopoezę, następnie trombopoezę, a na końcu erytropoezę. Wykazuje również działanie cytostatyczne w stosunku do guzów litych i jest stosowany w leczeniu skojarzonym. Łatwo przechodzi przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, osiągając maksymalne stężenie po 3 h. Lek dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając największe stężenie po 1 ÷ 2 h, T_{0,5} wynosi 2 h. Lek jest metabolizowany w wątrobie w niewielkim stopniu, wydalana się z moczem w 80% w stanie niezmienionym w ciągu 12 h.

Tabela 1.**Klasyfikacja *N*-hydroksymocznika**

Symbol grupy	Nazwa grupy
L	leki przeciwnowotworowe i immunomodulujące
L 01	cytostatyki
L 01 X	pozostałe leki przeciwnowotworowe
L 01 XX	inne
L 01 XX 05	<i>N</i> -hydroksymocznik (hydroksykarbamid)

N-Hydroksymocznik jest stosowany w leczeniu przewlekłego zespołu mieloproliferacyjnego, a w szczególności: przewlekłej białaczki szpikowej, samoistnej nadpłytkowości, czerwienicy prawdziwej, a także w samoistnym zwłóknieniu szpiku. Bywa stosowany w leczeniu skojarzonym raka płaskokomórkowego krtani, czerniaka złośliwego, nieoperacyjnego raka jajnika, w niektórych nowotworach skóry w skojarzeniu z radioterapią, niekiedy w dermatologii w niektórych postaciach łuszczyca (łuszczyca krostkowa).

Wśród działań niepożądanych należy zwrócić uwagę na występowanie odwracalnego zahamowania czynności krwiotwórczej szpiku – niedokrwistości, leukopenii i małopłytkowości. Niekiedy mogą wystąpić zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego: brak łaknienia, nudności, wymioty, bóle brzucha i biegunka, a także skórne odczyny uczuleniowe, zapalenie jamy ustnej, obrzęk płuc, bóle i zawroty głowy, zmniejszenie stężenia żelaza i zwiększenie stężenia kwasu moczowego we krwi. Bardzo rzadko pojawiają się zaburzenia czynności nerek i oddawania moczu, wypadanie włosów, zaburzenia miesiączkowania i azoospermia. Duże dawki leku mogą spowodować sennność oraz wystąpienie takich objawów neurologicznych i psychicznych, jak: dezorientacja, halucynacje i drgawki.

N-Hydroksymocznik może powodować podrażnienie błon śluzowych oczu, układu oddechowego i pokarmowego. Działa drażniąco i uczulająco na skórę. Może być przyczyną aplazji szpiku kostnego. Wyniki badań laboratoryjnych substancji wskazują na jej działanie mutagenne. Działa ona szkodliwie na reprodukcję i rozrodczość zwierząt doświadczalnych i jest inhibitorem syntezy DNA u ludzi. Powtarzające się narażenie na *N*-hydroksymocznik o dużym stężeniu może powodować szkodliwe działanie na nerki i wątrobę, a także na ośrodkowy układ nerwowy. Lek powoduje również utratę włosów i rogowacenie skóry. Substancja ta jest sklasyfikowana jako szkodliwa – X_n, niebezpieczna ze względu na jej kumulowanie się w organizmie – R33 (MSDS 01002; *Fisherei* 2004). Podstawowe właściwości fizykochemiczne i toksykologiczne substancji zostały wymienione w tabeli 2.

Tabela 2.**Właściwości toksykologiczne *N*-hydroksymocznika**

Nazwa	<i>N</i> -Hydroksymocznik
Nazwa	hydroksymocznik
Wzór sumaryczny	CH ₄ N ₂ O ₂
Wzór strukturalny	

cd. tab. 2.

Nazwa	<i>N</i> -Hydroksymocznik
Synonimy	<i>N</i> -(Aminokarbonyl)hydroksylamina karbamohydroksamidowy kwas karbamohydroksymowy kwas hydroksykarbamid hydroksykarbamina
Kolor	biały
Forma	krystaliczny proszek, dwie formy kryształków
Temperatura wrzenia	rozkłada się
Temperatura topnienia	141 °C
Masa molowa	76,06
logK _{ow}	-1,80
Rozpuszczalność	bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w gorących alkoholach, nierozpuszczalny w etanolu i benzenie
Prężność par	$2,43 \cdot 10^{-3}$ mmHg w temp. 25 °C
Inne właściwości	labilna wilgotność stała prawa Henry`ego = $5,4 \cdot 10^{-11}$ atm m ³ mol ⁻¹ w temp. 25 °C stała reakcji rodnikowania hydroksylowego = $2 \cdot 10^{-12}$ cm ³ mol ⁻¹ S ₂ w temp. 25 °C
Toksyczność	człowiek: dootrzewnowo TDL _o 86 mg/kg droga pokarmowa TDL _o 80 mg/kg/D droga pokarmowa TDL _o 14 mg/kg droga pokarmowa TDL _o 450 mg/kg/21D droga pokarmowa TDL _o 600 mg/kg/30D mysz: dootrzewnowo LD ₅₀ 5800 mg/kg podskórnice LD ₁₀ 2400 mg/kg dożylnie LD ₅₀ 2350 mg/kg droga pokarmowa LD ₅₀ 7330 mg/kg szczur: dootrzewnowo LD ₅₀ 4700 mg/kg droga pokarmowa LD ₅₀ 5760 mg/kg

PROCEDURA ANALITYCZNA

1. Zakres metody

W niniejszej procedurze podano metodę oznaczania zawartości *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Najmniejsze stężenie *N*-hydroksymocznika, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi 0,001 mg/m³.

2. Norma powołana

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

Metoda polega na zatrzymaniu aerozolu *N*-hydroksymocznika na filtrze z włókna szklanego, wymywaniu analitu wodą destylowaną i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki 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 niebezpiecznymi

Czynności związane z *N*-hydroksymocznikiem należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem. Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji uprawnionym instytucjom.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. *N*-Hydroksymocznik

Stosować jako substancję wzorcową *N*-hydroksymocznik według punktu 4.1.

5.2. Metanol

Stosować metanol według punktu 4.1.

5.3. Woda destylowana

Stosować wodę destylowaną o czystości do HPLC.

5.4. Roztwór wzorcowy podstawowy

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 100 ml należy odważyć około 16 mg *N*-hydroksymocznika według punktu 5.1., kolbę zważyć, uzupełnić do kreski wodą destylowaną według punktu 5.3. i dokładnie wymieszać. Stężenie *N*-hydroksymocznika w tak przygotowanym roztworze wynosi około 160 µg/ml. Obliczyć dokładną zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

5.5. Roztwór wzorcowy pośredni

Do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml odmierzyć 2,5 ml roztworu wzorcowego podstawowego według punktu 5.4. i uzupełnić wodą destylowaną według punktu 5.3. do kreski. Stężenie *N*-hydroksymocznika w tak przygotowanym roztworze wynosi około 16 µg/ml. Obliczyć dokładną zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

5.6. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb pomiarowych o pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 0,1; 0,5; 1; 2; 4 i 8 ml roztworu wzorcowego pośredniego według punktu 5.5., uzupełnić do kreski wodą destylowaną według punktu 5.3. i wymieszać. Obliczyć zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml tak przygotowanych roztworów.

5.7. Roztwór do wyznaczania współczynnika odzysku

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 10 ml odmierzyć 4,5 ml roztworu wzorcowego podstawowego według punktu 5.4., uzupełnić do kreski wodą destylowaną według punktu 5.3. i dokładnie wymieszać. Stężenie *N*-hydroksymocznika w tak przygotowanym roztworze wynosi około 72 µg/ml. Obliczyć dokładnie zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

Roztwory przygotowane według punktów 5.4., 5.5., 5.6. i 5.7. przechowywane w chłodziarce są trwałe przez 10 dni.

5.8. Filtry z włókna szklanego

Do pobierania próbek powietrza stosować filtry włókna szklanego o średnicy 37 mm lub inne równoważne.

Czystość stosowanych filtrów należy zbadać chromatograficznie oraz wyznaczyć współczynnik odzysku *N*-hydroksymocznika według punktu 11.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Należy stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym DAD i pętlą dozowniczą o pojemności 50 μ l oraz elektronicznym integratorem.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Należy stosować kolumnę chromatograficzną umożliwiającą rozdział *N*-hydroksymocznika od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.: kolumnę stalową Partisil 10 ODS o długości 25 cm, średnicy wewnętrznej 4,6 mm i uziarnieniu 0,25 μ m.

6.3. Mikrostrzykawki

Stosować mikrostrzykawki do cieczy o pojemności: 100; 500 i 1000 μ l.

6.4. Kolby Erlenmayera do wymywania

Stosować kolby Erlenmayera o pojemności około 25 ml z korkami zapewniającymi szczelne zamknięcie kolb.

6.5. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości według punktu 7.

6.6. Kolby pomiarowe

Stosować kolby szklane o pojemności: 10; 25 i 100 ml.

6.7. Pipeta szklana

Stosować pipetę do cieczy o pojemności 5 ml.

6.8. Nasadki filtracyjne

Do filtrowania analizowanych roztworów stosować nasadkę filtracyjną z filtrem z włókna szklanego o średnicy porów 0,45 μ m.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie PN-Z-04008-7:2002/Az1:2004. W miejscu pobierania próbek przez filtr szklany według punktu 5.8. przepuścić 480 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości nie większym niż 2 l/min. Pobrane próbki przechowywane w lodówce są trwałe 30 dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać warunki pracy chromatografu, aby uzyskać rozdział *N*-hydroksymocznika od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny o parametrach według punktu 6.2., oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

– faza ruchoma	woda destylowana/metanol 95: 5 (v/v)
– przepływ fazy ruchomej	0,5 ml/min
– temperatura kolumny	pokojowa
– długość fali analitycznej	214 nm
– pętla dozownicza	50 µl.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić za pomocą pętli dozowniczej po 50 µl roztworów wzorcowych roboczych według punktu 5.6. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż $\pm 5\%$ tej wartości. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml roztworów wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbki powietrza przenieść filtr z włókna szklanego do kolb Erlenmayera według punktu 6.4. Następnie dodać po 3 ml roztworu wody destylowanej według punktu 5.3., kolby szczelnie zamknąć i pozostawić na 30 min, wstrząsając ich zawartość co pewien czas. Następnie roztwory znad filtra przefiltrować, stosując nasadki filtracyjne według punktu 6.8. i wykonać oznaczenie chromatograficzne roztworu w warunkach określonych według punktu 8. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogramów powierzchnie pików *N*-hydroksymocznika według wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż $\pm 5\%$ tej wartości. Z krzywych wzorcowych odczytać zawartość oznaczanej substancji w 1 ml badanego roztworu.

11. Wyznaczanie współczynnika odzysku

W pięciu kolbach Erlenmayera według punktu 6.4. umieścić filtry z włókna szklanego i następnie dodać po 50 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku według punktu 5.7. mikrostrzykawką o pojemności 50 µl według punktu 6.3. W szóstej kolbie przygotować próbkę kontrolną zawierającą czysty filtr. Kolby szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać po 3 ml wody destylowanej według punktu 5.3. i wstrząsać zawartością kolb przez 30 min.

Jednocześnie wykonać oznaczenie badanej substancji co najmniej w trzech roztworach porównawczych przygotowanych przez dodanie do 3 ml wody destylowanej według punktu 5.3. po 100 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku według punktu 5.7. Oznaczenie badanej substancji wykonać według punktu 10.

Współczynnik odzysku *N*-hydroksymocznika (*d*) obliczyć na podstawie wzoru:

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

w którym:

- P_d – średnia powierzchnia pików *N*-hydroksymocznika na chromatogramach roztworów po desorpcji,
- P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji *N*-hydroksymocznika na chromatogramach roztworu kontrolnego,
- P_p – średnia powierzchnia pików *N*-hydroksymocznika na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku *N*-hydroksymocznika (\bar{d}) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Współczynnik odzysku należy zawsze oznaczać dla każdej nowej partii stosowanych do pochłaniania filtrów z włókna szklanego.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenia *N*-hydroksymocznika (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{C_1}{V \cdot \bar{d}} \cdot 3,$$

w którym:

- C_1 – stężenie *N*-hydroksymocznika w roztworze znad filtra odczytane z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,
- V – objętość przepuszczonego powietrza przez filtr, w litrach sześciennych,
- \bar{d} – średnia wartość współczynnika odzysku wyznaczonego według punktu 11.,
- 3 – objętość wody destylowanej użytej do wymywania *N*-hydroksymocznika z filtrów, w mililitrach.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując chromatograf ciekłowy z detektorem UV/VIS DAD firmy Elite La-Chrom firmy Merck-Hitachi, wyposażony w kolumnę Partisil 10 ODS o długości 25 cm i średnicy wewnętrznej 4 mm.

Na podstawie przeprowadzanych badań otrzymano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,16 ÷ 12,8 µg/ml (0,001 ÷ 0,08 mg/m³ dla próbki powietrza 480 l)
- granica wykrywalności, x_{gw} 0,05 µg/ml
- granica oznaczania ilościowego, x_{ozn} 0,17 µg/ml
- współczynnik korelacji, R 0,9971
- całkowita precyzja badania, V_c 1,89 ÷ 2,37%
- niepewność całkowita metody 5,44%.

MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA, ANNA OSYTEK, MAŁGORZATA POŚNIAK,
MAGDALENA GALWAS-GRZESZKIEWICZ

***N*-Hydroxyurea – determination method**

A b s t r a c t

This method is based on deposition of *N*-hydroxyurea on glass fiber filters, desorption with distilled water and chromatographic (HPLC) analysis of the resulting solution.

The determination limit of this method is 0.01 mg/m³.