



Oznaczanie *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas lub z detekcją fluorescencyjną¹

Determination of *N*-hydroxyurea in workplace air with high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry or fluorescence detection

MARZENA BONCZAROWSKA

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

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

MAGDALENA KRÓL

<https://orcid.org/0000-0001-7856-2968>

SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

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

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. J. Nofera w Łodzi

Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

Numer CAS 127-07-1

Streszczenie

N-Hydroksymocznik (HM) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białych kryształków pozbawionych zapachu. Związek ten jest stosowany jako cytostatyk w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej, anemii sierpowatej, nadpłytkowości samoistnej, a także czerwonicy prawdziwej. Bywa także stosowany jako cytostatyk w praktyce weterynaryjnej. Szkodliwe działanie *N*-hydroksymocznika może polegać na hamowaniu czynności szpiku kostnego oraz na szkodliwym działaniu na rozrodczość. Związek ten podejrzewany jest również o działanie mutagenne i genotoksyczne. Celem pracy było przygotowanie odpowiednio czulej i selektywnej metody oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy, która umożliwi pomiar stężenia tego związku, a następnie pozwoli na dokonanie oceny narażenia zawodowego. Metoda polega na zatrzymaniu *N*-hydroksymocznika na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji filtra za pomocą mieszaniny acetonitrylu: woda z dodatkiem (0,1%) kwasu mrówkowego i chromatograficznej analizie otrzymanego roztworu techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas lub po przekształceniu w pochodną techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Zaproponowany sposób ekstrakcji *N*-hydroksymocznika z filtrów umożliwia duży odzysk analitu. Średnia (dla trzech stężeń) wartość wydajności ekstrakcji wynosi 92,6%. Zależność wskazań spektrometru mas lub detektora fluorescencyjnego w funkcji stężeń *N*-hydroksymocznika ma charakter liniowy (odpowiednio $r = 0,9991$ i $r = 0,9990$) w zakresie stężeń $0,36 \div 7,2$ $\mu\text{g}/\text{ml}$. Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, spełnia wymagania normy PN-EN 482:2021-08 dla procedur dotyczących oznaczania czynników chemicznych. Opracowana metoda oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy została zapisana w postaci procedury analitycznej,

¹ Opracowano i wydano na podstawie wyników VI 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 III.PN.05 pt. „Opracowanie metod oznaczania 12 szkodliwych substancji chemicznych w powietrzu na stanowiskach pracy do oceny narażenia zawodowego”. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

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

Słowa kluczowe: *N*-hydroksymocznik, metoda analityczna, powietrze na stanowiskach pracy, metoda chromatografii cieczowej, nauka o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

Hydroxyurea (HM) in room temperature is a white crystalline solid. It is used as an antineoplastic drug in the therapy of chronic myelogenous leukemia, sickle cell anemia, and idiopathic thrombocytopenia. It is also used as cytostatic in veterinary practice. HM can cause bone marrow suppression and have negative impact on reproduction. It is also suspected to have mutagenic and genotoxic properties. The aim of the study was to prepare a suitably sensitive and selective method for the determination of hydroxyurea in air at workplaces, which will enable the measurement of concentrations of this compound and then allow occupational exposure to be assessed. This method is based on the collection of HM on glass fiber filter, extraction with a mixture of acetonitrile: water with addition of formic acid (0.1%), and chromatographic determination of the resulting solution by means of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry or fluorescence detection. The average extraction efficiency of HM from filters amounted to 105.5%. The method is linear ($r=0.9991$ or 0.9990) within the investigated working range from $0.36 \mu\text{g/ml}$ to $7.2 \mu\text{g/ml}$ for LC-MS/MS and LC-FLD techniques respectively. The method has good precision and accuracy and meets the requirements of EN 482:2021-08 for procedures for the determination of chemical agents. The developed method for the determination of doxorubicin hydrochloride in air at workplaces was written in the form of an analytical procedure, which is included in the Appendix. The thematic scope of the article includes the issues of health and safety and hygiene of the working environment being the subject of research in health sciences and environmental engineering.

Keywords: hydroxyurea, analytical method, air at workplaces, liquid chromatography method, health sciences, environmental engineering.

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

WPROWADZENIE

Charakterystyka substancji

N-Hydroksymocznik (HM) w temperaturze pokojowej występuje w postaci białych kryształków bez zapachu. *N*-Hydroksymocznik bardzo łatwo rozpuszcza się w wodzie i gorących alkoholach, natomiast bardzo słabo w etanolu i benzenie. Związek ten jest stosowany jako cytostatyk w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej oraz anemii sierpowatej i czerwonicy prawdziwej. Bywa stosowany jako cytostatyk w weterynarii w leczeniu nowotworów u zwierząt. Zawodowe narażenie na ten związek może mieć miejsce podczas czynności związanych z jego produkcją i stosowaniem w lecznictwie. Szkodliwe działanie *N*-hydroksymocznika może polegać na hamowaniu czynności szpiku kostnego oraz na szkodliwym działaniu na układ pokarmowy (np. wymioty, biegunki, brak łaknienia) lub na działaniu drażniącym na błony śluzowe oczu i skórę. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono również dane

na temat negatywnego wpływu związku na rozrodczość. *N*-Hydroksymocznik jest podejrzewany także o działanie teratogenne i embriotoksyczne oraz o właściwości mutagenne i genotoksyczne (Dobecka 2017; PubChem 2024).

W Unii Europejskiej *N*-hydroksymocznik nie ma zharmonizowanej klasyfikacji i oznakowania (Rozporządzenie... 2008). Większość producentów *N*-hydroksymocznika sklasyfikowała ten związek pod kątem jego działania mutagennego (Muta. 1B) oraz działania na rozrodczość (Repr. 2). Substancji tej przypisano następujące zwroty określające rodzaj zagrożenia:

- H340: Może powodować wady genetyczne
- H361: Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub dziecko w łonie matki (ECHA 2023).

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 r., zmieniającym rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników

szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracyz dnia 12 czerwca 2018 r. (DzU 2020, poz. 61) wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla *N*-hydroksymocznika (frakcja wdychalna) wynosi 0,01 mg/m³.

Opracowana w 2010 r. metoda oznaczania *N*-hydroksymocznika w środowisku pracy zakładała wykorzystanie do tego celu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (Szewczyńska i in. 2010), obejmując zakres oznaczania w granicach 0,001 ÷ 0,080 mg/m³. Opisana metoda nie uwzględnia jednocześnie konieczności wyodrębnienia frakcji wdychalnej powietrza determinującej sposób pobierania próbek do badań.

Celem prac badawczych było opracowanie odpowiednio czułej i selektywnej metody oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy, umożliwiającej pomiary jego stężenia zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 482, z uwzględnieniem konieczności wyodrębnienia frakcji wdychalnej powietrza wymaganej rozporządzeniem (Rozporządzenie... 2020).

Opracowaną metodę oznaczania *N*-hydroksymocznika przedstawiono w załączniku w formie procedury analitycznej.

Dobór techniki analitycznej

Do oznaczania *N*-hydroksymocznika stosowana jest technika spektrofotometrii w świetle widzialnym (El-Samman 2018; Sivakumar i in. 2013), fluorescencji (El-Kosasy 2003) lub metoda chromatografii cieczowej z takimi systemami detekcji, jak: spektrofotometria (Dias-Elias i in. 2014; Gordon i in. 2015; Legrand i in. 2017; Osytek i in. 2008; Smart i in. 2023; Szewczyńska i in. 2010), spektrometria mas (Krämer 2021; Marahatta, Ware 2017), chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (Garg i in. 2015; Kettani i in. 2009).

Większość prac dotyczy oznaczania *N*-hydroksymocznika w próbkach materiału biologicznego lub w preparatach farmaceutycznych. W dostępnej literaturze znaleziono dwie prace dotyczące oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy (Osytek i in. 2008; Szewczyńska i in. 2010). W obu pracach do pobierania próbek powietrza wykorzystano filtry z włókna szklanego, które były również wykorzystywane w oznaczeniach stężeń innych cytotatyków w powietrzu (Bonczarowska i in. 2018; Bonczarowska, Brzeźnicki 2020; Micoli i in. 2001; Sottani i in. 2000; Turci i in.

2000). Z tego względu zdecydowano o wykorzystaniu tego typu filtrów do opracowania metody oznaczania stężeń *N*-hydroksymocznika w powietrzu środowiska pracy z uwzględnieniem konieczności wyodrębnienia frakcji wdychalnej.

Z uwagi na wcześniejsze doświadczenia zgromadzone w trakcie opracowywania metod dla innych cytotatyków (Bonczarowska i in. 2018; Bonczarowska, Brzeźnicki 2020; Brzeźnicki i in. 2016) zdecydowano o wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) przy opracowywaniu metody oznaczania *N*-hydroksymocznika. Jednocześnie, opierając się na danych literaturowych, postanowiono sprawdzić możliwość zastosowania do tego celu innych systemów detekcji takich, jak np. fluorescencja (FLD) lub spektrofotometria (UV-VIS). Możliwość zastosowania innej niż LC-MS/MS techniki oznaczania stężeń *N*-hydroksymocznika została opisana w pracy Legrand i in. (2017). Opisana w cytowanej pracy metodyka zakładała przekształcenie obecnego w osoczu *N*-hydroksymocznika do ksantylamidu na drodze reakcji z ksanthydrolem. Powstała pochodna była oznaczana za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (LC-UV-VIS). Ksanthidrol (jako czynnik derywatyzujący) był również wykorzystywany w oznaczeniach mocznika (aminowego analogu *N*-hydroksymocznika) zarówno w wodzie (Zhou i in. 2023), jak i w karmie dla zwierząt (Krämer i in. 2021). W obu przypadkach do oznaczania stężeń powstałej pochodnej stosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (LC-FLD).

Z uwagi na wyższą w stosunku do metody spektrofotometrycznej czułość oznaczeń osiągniętych techniką LC-FLD zdecydowano o wykorzystaniu tej techniki przy opracowaniu alternatywnej metody oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Aparatura i materiały

W badaniach zastosowano aspiratory indywidualne GilAir 3 umożliwiające pobieranie próbek powietrza w strefie oddychania pracownika ze stałym strumieniem objętości 120 l/h (Sensidyne, USA) i próbki do poboru frakcji wdychalnej typu IOM (Zefon, USA). Do wykonania oznaczeń stosowano chromatograf cieczowy Waters

Acquity I Class Plus wyposażony w: binarny system pomp wysokociśnieniowych, dozownik automatyczny, termostat oraz komputerową stację akwizycji i obróbki danych, kolumnę analityczną Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm wypełnioną złożem typu C18 o średnicy ziaren 1,8, μm sprzężony z tandemowym spektrometrem mas Waters Xevo TQ-XS (Waters, USA), oraz chromatograf cieczowy Waters Acquity Arc wyposażony w: poczwórny system pomp wysokociśnieniowych, dozownik automatyczny (autosampler), termostat, detektor fluorescencyjny Waters 2475, komputerową stację akwizycji i obróbki danych oraz kolumnę analityczną Waters XTerra 150 mm × 2,1 mm wypełnioną złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 μm (Waters, USA), a także mieszadło mechaniczne (uniwersalne mieszadło hematologiczne WIGO, Polska). Do odważania wzorców wykorzystano wagę analityczną (Sartorius Research, USA).

Ponadto stosowano: naczynka szklane o pojemności 2 ml i 4 ml, kolby pomiarowe o pojemności: 1 ml, 2 ml, 5 ml i 1000 ml, pipety automatyczne nastawne o pojemności 0,01 ÷ 0,1 ml; 0,1 ÷ 1 ml i 0,5 ÷ 5 ml, filtry z PTFE o średnicy 13 mm i średnicy porów 0,45 μm (LLG), a także filtry z włókna szklanego (np. Whatman GF/A) o średnicy 25 mm i wielkości porów 1,6 μm .

Odczynniki i wzorce

Podczas badań stosowano następujące odczynniki o stopniu czystości przynajmniej cz.d.a: acetonitryl o czystości do LC-MS (J.T. Baker), *N*-hydroksymocznik (CRM Supelco), metotreksat (CRM Supelco), cyklofosfamid (CRM Supelco), etopozyd (Merck), 5-fluorouracyl (CRM Supelco), chlorowodorek doksorubicyny (CRM Supelco), ifosfamid (CRM Supelco), paklitaksel (Supelco), docetaksel (Supelco), kwas mrówkowy (Alchem), kwas solny (Alchem), propan-1-ol (Waters), ksanthydrol (Merck), wodę o czystości do LC-MS (Hydrolab Polska).

Ponadto stosowano roztwór do ekstrakcji (mieszanka acetonitrylu i wody w stosunku 1: 1 z dodatkiem kwasu mrówkowego stanowiącym 0,1% mieszaniny) oraz roztwór do derywatywacji 0,02 mol/l (0,4 g ksanthydrolu w 100 ml izopropanolu).

Założenia opracowywanej metody

Przy opracowaniu metody oznaczania *N*-hydroksymocznika w powietrzu na stanowiskach pracy przyjęto następujące założenia:

- pobieranie jednej próbki na zmianę roboczą
- objętość pobranego powietrza nie mniej niż 720 l
- zakres pomiarowy 0,36 ÷ 7,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, co dla próbki powietrza 720 l odpowiada zakresowi 0,001 ÷ 0,02 mg/m^3 .

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

Badania dotyczące uzyskania optymalnych warunków analizy *N*-hydroksymocznika techniką LC-MS/MS wykonywano z użyciem chromatografu cieczowego (Waters Acquity I Class Plus) sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (Waters Xevo TQ-XS) oraz kolumny analitycznej Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm wypełnionej złożem typu C18 o średnicy ziaren 1,8 μm . Jako fazę ruchomą (elucja gradientowa) zastosowano mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego. Optymalizacji poddano następujące parametry pracy detektora mas:

- napięcia: kapilary, sondy ESI, źródła jonów, ekstraktora i soczewek
- temperatura desolwatacji i źródła jonów
- przepływy gazów
- parametry pracy komory kolizyjnej.

Charakterystyczna dla *N*-hydroksymocznika fragmentacja w komorze kolizyjnej jonu molekularnego tego związku ($\text{M}+\text{H}^+$), (m/z 76,6) do jonu potomnego (m/z 44,03) została dobrana na podstawie danych literaturowych (Marahatta, Ware 2017).

W celu dobrania optymalnych parametrów rozdzielania chromatograficznego mieszaniny cytostatyków oraz parametrów pracy spektrometru mas przygotowano mieszaninę złożoną z dziewięciu związków z tej grupy: hydroksymocznika, metotreksatu, cyklofosfamidu, 5-fluorouracylu, etopozydu, doksorubicyny, ifosfamidu, docetakselu i paklitakselu, którą analizowano w warunkach charakterystycznych dla oznaczeń *N*-hydroksymocznika.

Zastosowanie w analizie chromatograficznej kolumny analitycznej Waters ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2,1 mm wypełnionej złożem typu C18 o średnicy ziaren 1,8 μm , wymywanej mieszaniną

acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (elucja gradientowa) umożliwia rozdzielenie analizowanych związków.

Optymalne warunki analizy *N*-hydroksymocznika techniką LC-MS/MS przedstawiono

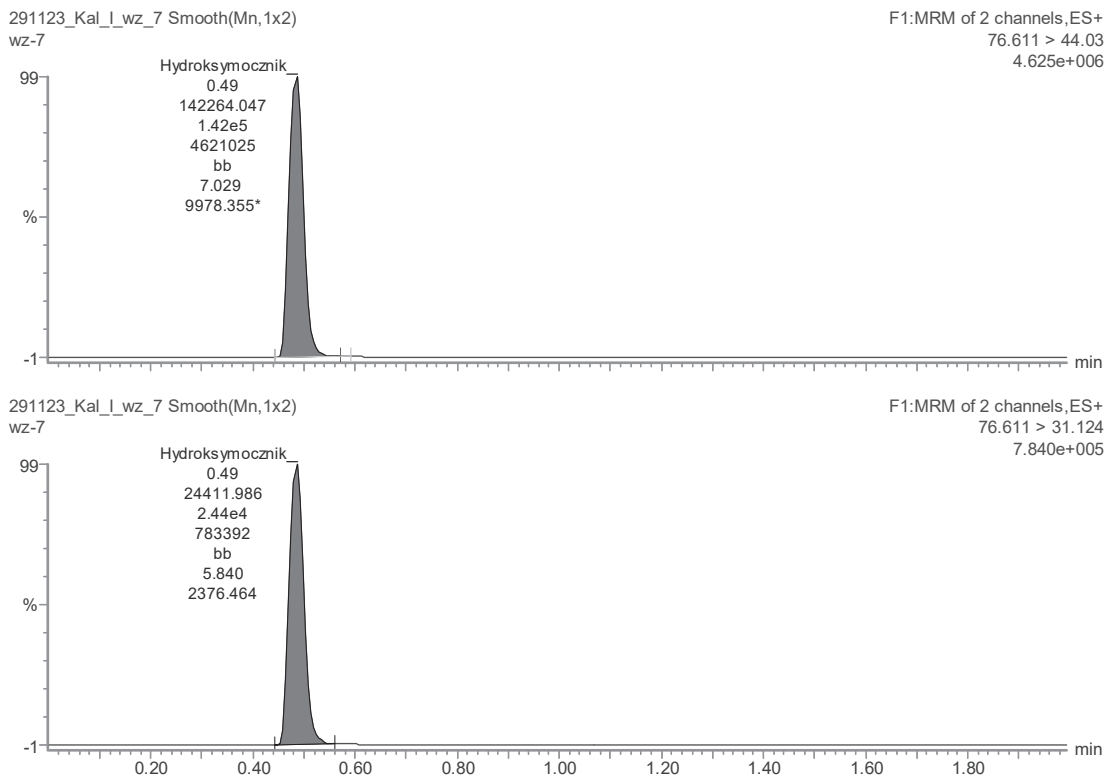
w tabelach 1 i 2. Chromatogram mieszaniny cytotatyków zarejestrowany w warunkach charakterystycznych dla *N*-hydroksymocznika przedstawiono na rycinie 1.

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

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

Tabela 2. Warunki pracy tandemowego spektrometru mas podczas analiz *N*-hydroksymocznika (HM)
Table 2. Working conditions of the tandem mass spectrometer during *N*-hydroxyurea (HM) analyzes

Analiza MS/MS	Parametr	HM
Tryb MRM (Multiple Reaction Monitoring)	Źródło jonów	
	jonizacja	ES +
	napięcie kapilary	1,5 kV
	napięcie źródła jonów	40 V
HM: jon macierzysty 76,61 m/z jony potomne: – kwantyfikujący 44,03 m/z – potwierdzający 31,12 m/z	temperatura źródła jonów	150°C
	temperatura desolwatacji	600°C
	przepływ azotu w źródle jonów	150 l/h
	przepływ gazu desolwatacyjnego (azot)	1100 l/h
	ciśnienie gazu nebulizacyjnego	7 bar
	Komora kolizyjna	
	przepływ gazu kolizyjnego (argon)	0,15 ml/min
	energia kolizji (tryb MS/MS)	20 eV
	Analizator	
	rozdzielczość niskich mas 1 (LMR-1)	2,82
	rozdzielczość wysokich mas 1 (HMR-1)	14,55
	energia jonów 1	-0,4
	rozdzielczość niskich mas 2 (LMR-2)	2,83
	rozdzielczość wysokich mas 2 (HMR-2)	14,87
energia jonów 2	0,4	
wzmocnienie	1	



Rycina 1. Chromatogram mieszaniny (hydroksymocznik (RT 0,49), metotreksat, cyklofosamid, 5-fluorouracyl, etopozyd, doksorubicyna, ifosfamid, docetaksel i paklitaksel)

Figure 1. Chromatogram of mixture (hydroxyurea (RT 0.49), methotrexate, cyklophosphamide, 5-fluorouracyl, etoposide, doxorubicin, iphosphamide, docetaxel and paklitaxel)

Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej i parametrów pracy chromatografu cieczonego z detektorem fluorescencyjnym (LC-FLD)

W badaniach wykorzystano zestaw złożony z chromatografu cieczonego Waters Acquity Arc wyposażonego w detektor fluorescencyjny Waters 2475. Możliwość rozdzielania wieloskładnikowej mieszaniny cytostatyków testowano przy użyciu kolumny analitycznej Waters XTerra 150 mm × 2,1 mm wypełnionej złożem typu C18 o średnicy ziaren 5 μm. Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem 0,1-procentowego kwasu mrówkowego (mieszaniny o zmiennym w czasie składzie procentowym). Długość fali wzbudzenia i emisji ustalono eksperymentalnie, wykorzystując możliwości stosowanego detektora fluorescencyjnego do równoczesnej rejestracji sygnałów przy różnych długościach fal wzbudzenia i emisji.

Przekształcenie obecnego w próbce *N*-hydroksymocznika w pochodną (reakcja z ksanthydrolelem) umożliwia oznaczenie tego związku przy

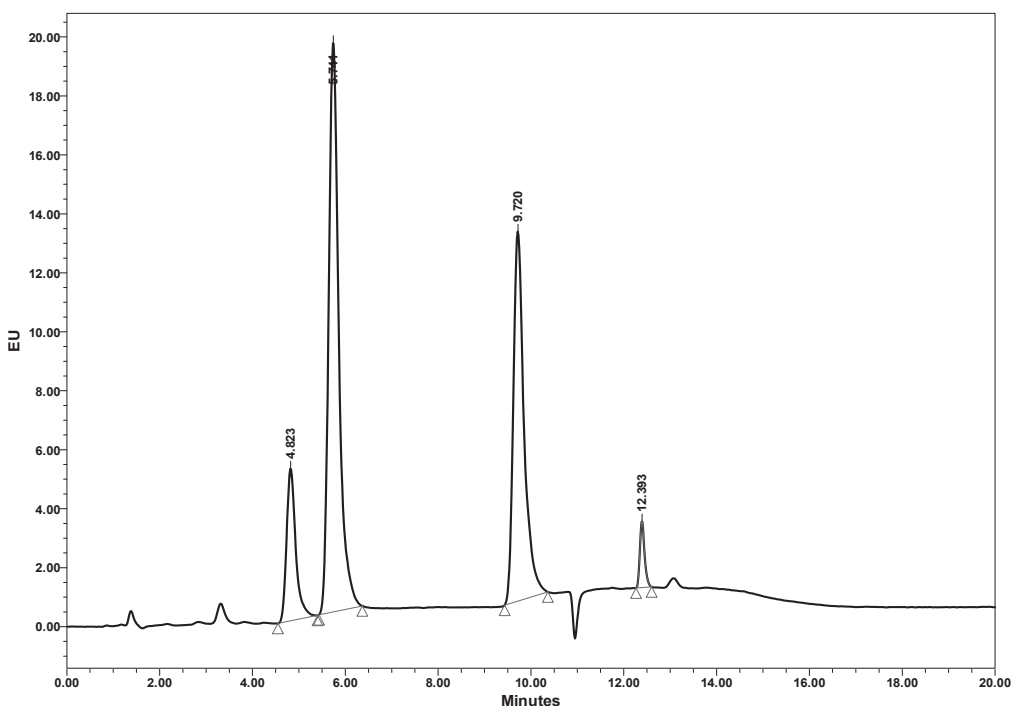
użyciu detektora fluorescencyjnego. Zastosowanie w oznaczeniach kolumny analitycznej Waters XTerra oraz właściwy (z uwagi na silnie polarny charakter *N*-hydroksymocznika) dobór składu fazy ruchomej zapewnia możliwość selektywnego oznaczenia tego związku w przypadku obecności innych cytostatyków, mocznika oraz nadmiaru użytego do przeprowadzenia reakcji ksanthydrolu (ryc. 2). Właściwy dobór długości fali wzbudzenia i emisji zapewnia w danych warunkach analitycznych odpowiednią czułość oznaczeń *N*-hydroksymocznika. Optymalne warunki pracy chromatografu podano w tabeli 3.

Badanie zakresu stosowania i liniowości metody analitycznej

Technika LC-MS/MS

W badaniach jako wzorzec *N*-hydroksymocznika zastosowano certyfikowany materiał odniesienia (CRM).

W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania *N*-hydroksymocznika (1/10 ÷ 2 NDS) przygotowano trzy serie po sześć filtrów z włókna szklanego,



Rycina 2. Chromatogram wzorca *N*-hydroksymocznika (HM), (RT – 4,823), mocznika (RT – 5,744) i ksanthydrołu (RT – 9,720). Detektor FLD λ_{wzb} – 240 nm, λ_{em} – 308 nm

Figure 2. Chromatogram of *N*-hydroxyurea (HM) standard (RT – 4.823), urea (rt – 5.744) and xanthinol (RT – 9.720). Detector FLD λ_{ex} – 240 nm, λ_{em} – 308 nm

Tabela 3. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym

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

Kolumna analityczna Waters XTerra			
Faza ruchoma		roztwór kwasu mrówkowego w wodzie A, %	roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu B, %
Program – gradient (v: v)	0 min	70	30
	5 min	70	30
	6 min	20	80
	10 min	20	80
	10,5 min	70	30
	20 min	70	30
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej		0,3 ml/min	
Temperatura kolumny		40°C	
Objętość próbki		5,0 μ l	
Długość fali wzbudzenia/emisji		240 nm/308 nm	

na które naniesiono po 10 μ l roztworów wzorcowych związku o stężeniach: 72 μ g/ml; 144 μ g/ml; 288 μ g/ml; 720 μ g/ml; 1080 μ g/ml i 1440 μ g/ml. Na siódmy filtr jako ślepą próbkę naniesiono 10 μ l roztworu do ekstrakcji będącego mieszaniną acetonitrylu i wody w stosunku 1: 1 z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości stanowiącej 0,1% mieszaniny. Po dokładnym

odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do naczynek o pojemności 4 ml, dodano 2 ml roztworu do ekstrakcji i poddano 30-minutowemu wymywaniu za pomocą mieszadła mechanicznego. Stężenia *N*-hydroksymocznika w tak przygotowanych roztworach wynosiły: 0 μ g/ml; 0,36 μ g/ml; 0,72 μ g/ml; 1,44 μ g/ml; 3,6 μ g/ml; 5,4 μ g/ml i 7,2 μ g/ml.

Uzyskane ekstrakty przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm i poddano analizie chromatograficznej.

Wyniki badania liniowości metody w przyjętym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 4 i graficznie na rycinie 3. Z przedstawionych danych wynika, że zależność odpowiedzi spektrometru mas na analizowane stężenia *N*-hydroksymocznika w badanym zakresie stężeń 0,36 ÷ 7,2 $\mu\text{g/ml}$ ma charakter liniowy, co dla próbki powietrza o objętości 720 l odpowiada zakresowi 0,001 ÷ 0,02 mg/m^3 . Zależność tę opisuje równanie: $y = 19\,763x + 1285,2$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) dla trzech serii wzorcowych wynosi 5,5%, a współczynnik regresji $r = 0,9991$.

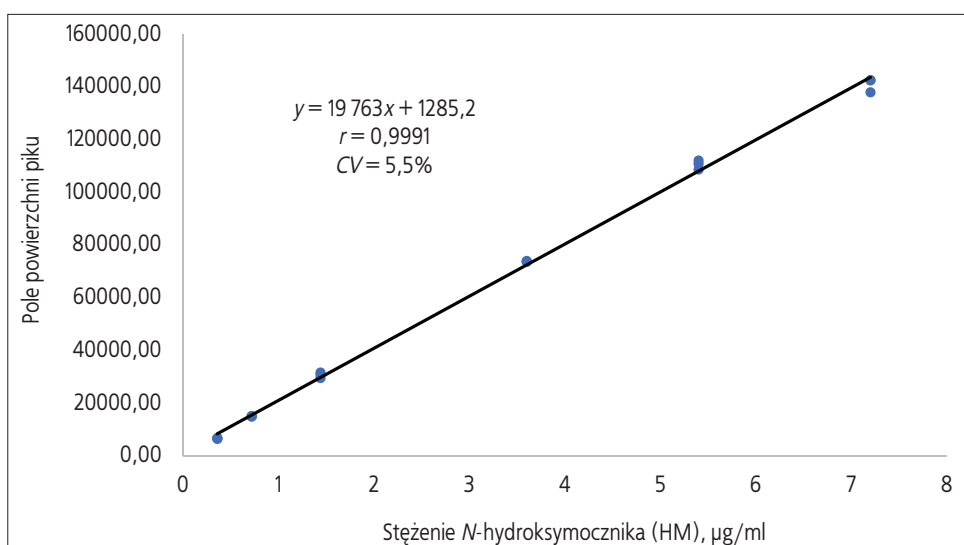
Technika LC-FLD

W celu zbadania zakresu roboczego metody oznaczania *N*-hydroksymocznika (1/10 ÷ 2 NDS) techniką LC-FLD przygotowano identyczny zestaw filtrów, jak w przypadku oznaczeń techniką LC-MS/MS. Filtry z naniesionym *N*-hydroksymocznikiem przeniesiono do naczynek o pojemności 4 ml, do których dodano po 2 ml roztworu do ekstrakcji. Próbkę poddano 30-minutowemu wymywaniu za pomocą mieszadła mechanicznego. Uzyskane ekstrakty przepuszczano przez filtry strzykawkowe z membraną z PTFE o średnicy porów 0,45 μm . Z oczyszczonych ekstraktów pobrano po 0,95 ml roztworu, przeniesiono do naczynek o pojemności

Tabela 4. Wyniki wzorcowania *N*-hydroksymocznika (HM) na filtrach z włókna szklanego – LC-MS/MS

Table 4. Linearity testing of *N*-hydroxyurea (HM) on glass fiber filter – LC-MS/MS method

Badane parametry	Stężenie <i>N</i> -hydroksymocznika, $\mu\text{g/ml}$					
	0,36 $\mu\text{g/ml}$	0,72 $\mu\text{g/ml}$	1,44 $\mu\text{g/ml}$	3,6 $\mu\text{g/ml}$	5,4 $\mu\text{g/ml}$	7,2 $\mu\text{g/ml}$
Pole powierzchni pików (PPP)	6532,2	14 924,2	29 557,5	73 960,5	108 638,0	142 557,8
	6585,0	15 114,9	31 663,5	73 655,7	112 061,7	142 466,3
	6871,2	15 107,3	30 896,5	73 701,8	110 753,4	137 907,0
Średnia PPP	6662,8	15 048,8	30 705,8	73 772,7	110 484,4	140 977,0
Odchylenie standardowe, SD	182,4	108,0	1065,9	164,3	1727,7	2659,1
Współczynnik zmienności, CV, %	2,7	0,7	3,5	0,2	1,6	1,9



Rycina 3. Krzywa wzorcowa *N*-hydroksymocznika (HM) w zakresie 0,36 ÷ 7,2 $\mu\text{g/ml}$ – LC-MS/MS

Figure 3. *N*-Hydroxyurea (HM) calibration curve in the range 0.36–7.2 $\mu\text{g/ml}$ – LC-MS/MS

2 ml i dodano po 0,05 ml zakwaszonego, izopropanolowego roztworu ksanthidolu o stężeniu 0,02 mol/l. Roztwory pozostawiono bez dostępu światła na 60 min, a następnie poddano analizie chromatograficznej w ustalonych dla techniki LC-FLD warunkach. Wyniki badania liniowości metody w przyjętym zakresie stężeń przedstawiono w tabeli 5 i graficznie na rycinie 4. Z zamieszczonych w tabeli danych wynika, że zależność odpowiedzi detektora FLD od stężenia *N*-hydroksymocznika ma charakter liniowy w zakresie stężeń $0,36 \div 7,2 \mu\text{g/ml}$. Zależność tę opisuje równanie:

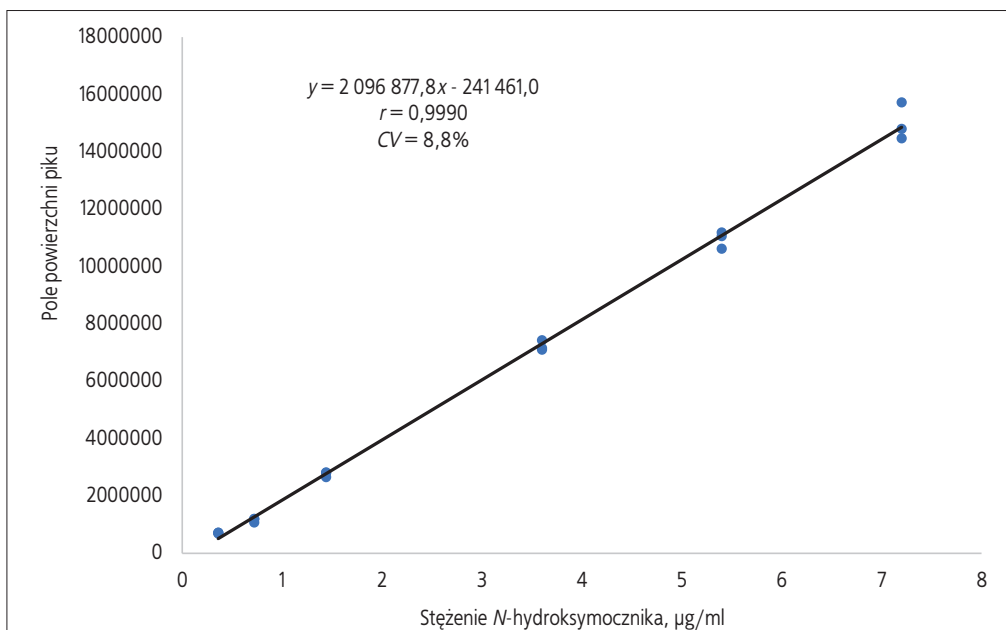
$y = 2\,096\,877,8x - 2\,412\,461$. Wyrażony w procentach współczynnik zmienności (CV) współczynników kalibracji obliczonych dla poszczególnych stężeń *N*-hydroksymocznika (dla trzech serii wzorcowych) wynosi 8,8%, a współczynnik regresji $r = 0,9990$.

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności metody

Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności *N*-hydroksymocznika przeprowadzono zgodnie

Tabela 5. Wyniki wzorcowania *N*-hydroksymocznika (HM) na filtrze z włókna szklanego – LC-FLD
Table 5. Linearity testing of *N*-hydroxyurea (HM) on glass fiber filter – LC-FLD method

Badane parametry	Stężenie <i>N</i> -hydroksymocznika, $\mu\text{g/ml}$					
	0,36 $\mu\text{g/ml}$	0,72 $\mu\text{g/ml}$	1,44 $\mu\text{g/ml}$	3,6 $\mu\text{g/ml}$	5,4 $\mu\text{g/ml}$	7,2 $\mu\text{g/ml}$
Pole powierzchni pików (PPP)	719 392 721 381 693 050	1 190 393 1 199 753 1 076 285	2 817 841 2 801 871 2 655 511	7 105 368 7 427 577 7 153 870	10 618 759 11 184 449 11 063 291	14 467 445 15 720 575 14 797 550
Średnia PPP	711 274,3	1 155 477,0	2 758 407,7	7 228 938,3	10 955 499,7	14 995 190,0
Odchylenie standardowe, SD	15 814,0	68 741,8	89 468,2	173 727,1	297 851,5	649 522,8
Współczynnik zmienności, CV, %	2,2	5,9	3,2	2,4	2,7	4,3



Rycina 4. Krzywa wzorcowa *N*-hydroksymocznika (HM) w zakresie $0,36 \div 7,2 \mu\text{g/ml}$ – LC-FLD
Figure 4. *N*-Hydroxyurea (HM) calibration curve in the range $0.36\text{--}7.2 \mu\text{g/ml}$ – LC-FLD

z wytycznymi zawartymi w opracowaniu Dobeckiego (2000). W tym celu wzorzec *N*-hydroksymocznika o stężeniu 0,36 µg/ml rozcieńczono cztery razy. Przygotowano 20 rozcieńczonych roztworów, które poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach określonych dla techniki LC-MS/MS.

W celu określenia granic wykrywalności i oznaczalności dla techniki LC-FLD przygotowano 20 roztworów próbek ślepych złożonych z 0,95 ml roztworu do ekstrakcji (mieszanka acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego) oraz 0,05 ml izopropanolowego roztworu ksanthynolu. Roztwory pozostawiono bez dostępu światła na 60 min, a następnie poddano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach.

Wyniki analiz dotyczących wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności *N*-hydroksymocznika z zastosowaniem techniki LC-MS/MS i LC-FLD przedstawiono w tabeli 6. Obliczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe pól powierzchni pików o czasie retencji *N*-hydroksymocznika. Uwzględniając współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej obliczono granice wykrywalności i oznaczania ilościowego metody dla stosowanych systemów detekcji. Wartości te dla technik LC-MS/MS i LC-FLD wynoszą odpowiednio: 0,016 µg/ml i 0,053 µg/ml oraz 0,001 µg/ml i 0,003 µg/ml.

Badanie warunków pobierania próbek powietrza

W celu zbadania wpływu założonych warunków pobierania próbek powietrza na retencję *N*-hydroksymocznika pobranego na filtr z włókna szklanego, przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych o stężeniach odpowiadających zakresowi badanej metody od 1/10 do 2 wartości NDS: 72 µg/ml; 288 µg/ml i 1440 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika, filtry umieszczono w próbnikach umożliwiających pobieranie frakcji wdychalnej. Za pomocą aspiratorów indywidualnych przez filtry przepuszczono 720 l powietrza ze stałym strumieniem objętości 2 l/min. Po tym czasie filtry przeniesiono do naczynek szklanych o pojemności 4 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml roztworu do ekstrakcji oraz mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 µm, a następnie poddano analizie chromatograficznej (LC-MS/MS) w ustalonych wcześniej warunkach. Wartości pól powierzchni pików badanego związku (uzyskane z tak przeprowadzonych analiz) porównano z wynikami analiz ekstraktów z filtrów, na które naniesiono roztwory wzorcowe *N*-hydroksymocznika o takich samych stężeniach, przez które nie przepuszczano powietrza (roztwory kontrolne).

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

Badane parametry	Technika analityczna			
	LC-MS/MS		LC-FLD	
Pole powierzchni pików o czasie retencji HM	724,8	473,3	1896	2726
	590,6	446,9	3805	3684
	722,7	439,5	2900	2882
	573,5	578,3	3940	2227
	655,4	516,7	2835	2475
	535,9	598,2	2982	2653
	535,1	535,5	2631	2908
	543,4	797,1	4196	2689
	527,3	762,4	2736	2313
	628,9	718,8	3409	3375
	Średnie pole powierzchni, $n = 20$	595,2		2963,1
Odchylenie standardowe, S	104,6		599,7	
Współczynnik zmienności, CV , %	17,6		20,2	
Granica wykrywalności (GW), µg/ml	0,016		0,001	
Granica oznaczalności (GO), µg/ml	0,053		0,003	

Wyniki badań dotyczących warunków pobierania próbek powietrza przedstawiono w tabeli 7 (oznaczenia techniką LC-MS/MS). Przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje powstawania istotnych strat analizowanego związku. Średnie wartości współczynnika odzysku *N*-hydroksymocznika z filtrów z włókna szklanego, przez który przepuszczono 720 l powietrza, dla trzech analizowanych stężeń: 0,72 µg; 2,88 µg i 14,4 µg na filtrze wynoszą odpowiednio: 88% (*SD* – 4,4); 96,1% (*SD* – 4,4) i 93,7% (*SD* – 1,3). Średnia dla trzech stężeń wartość odzysku wynosi 92,6% (*SD* – 4,9).

Badanie precyzji metody z wykorzystaniem technik LC-MS/MS i LC-FLD

W celu zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia przygotowano trzy serie po dziesięć filtrów, na które naniesiono

po 10 µl roztworów wzorcowych *N*-hydroksymocznika o stężeniach odpowiadających zakresowi badanej metody od 1/10 do 2 wartości NDS, tj.: 72 µg/ml; 288 µg/ml i 1440 µg/ml.

Filtry poddano 30-minutowej ekstrakcji za pomocą 2 ml mieszaniny ekstrakcyjnej i mieszała mechanicznego, ekstrakty bezpośrednio po przesączeniu poddano analizie chromatograficznej techniką LC-MS/MS.

W przypadku techniki LC-FLD filtry do oznaczeń przygotowano identycznie jak w przypadku oznaczeń techniką LC-MS/MS. Po przeprowadzeniu ekstrakcji za pomocą 2 ml mieszaniny ekstrakcyjnej 0,95 ml ekstraktów każdego z badanych roztworów przeniesiono do naczynek o pojemności 2 ml, dodano 0,05 ml izopropanolowego roztworu ksanthidolu i pozostawiono bez dostępu światła na 60 min. Po tym czasie roztwory poddano analizie chromatograficznej w ustalonych dla techniki LC-FLD warunkach.

Tabela 7. Badanie warunków pobierania próbek powietrza do oznaczenia *N*-hydroksymocznika (HM)
Table 7. Investigation of air sampling conditions for *N*-hydroxyurea (HM) determinations

Medium pochłaniające	Stężenie <i>N</i> -hydroksymocznika, µg/ml	Pole powierzchni piku		Współczynnik wydajności ekstrakcji, %	Średnia wartość współczynnika wydajności ekstrakcji, %
		roztwór kontrolny	roztwór po desorpcji		
Filtr z włókna szklanego	0,36	5296,6 5513,5 6081,2	4766,1	84,6	88
			4917,3	87,3	
			5118,7	90,9	
			4876,6	86,6	
			4692,0	83,3	
			5371,3	95,4	
	<i>SD</i>	4,4			
	<i>CV</i>	5%			
	1,44	28 300,4 29 274,9 30 681,1	29 139,7	99,1	96,1
28 435,0			96,7		
29 933,0			101,7		
27 576,8			93,7		
26 175,4			89,0		
28 425,4			96,6		
<i>SD</i>	4,4				
<i>CV</i>	4,6%				
7,2	146 354,8 147 649,1 143 103,0	134 069,48	92,0	93,7	
		136 120,47	93,4		
		139 630,53	95,8		
		137 087,52	94,1		
		135 456,09	93,0		
		136 652,38	93,8		
<i>SD</i>	1,3				
<i>CV</i>	1,4%				
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr</i> , %			92,6		
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>			4,9		
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			5,3		

Wyniki badań precyzji oznaczeń *N*-hydroksymocznika obiema technikami analitycznymi przedstawiono w tabelach 8 i 9. Wskazują one na to, iż założone warunki wykonania analizy pozwalają na precyzyjne wykonanie oznaczeń stężeń *N*-hydroksymocznika. Współczynniki zmienności (*CV*) rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla stężeń: 0,36 µg/ml; 1,44 µg/ml i 7,2 µg/ml w przypadku techniki LC-MS/MS wynoszą odpowiednio: 0,35 (9,45); 1,58 (9,67) i 7,67 (6,43), natomiast w przypadku techniki LC-FLD wynoszą odpowiednio: 0,39 (6,17); 1,31 (5,52) i 6,98 (2,8).

Badanie trwałości próbek

W celu zbadania trwałości pobranych na filtry próbek powietrza zawierającego *N*-hydroksymocznik przygotowano trzy serie po dwadzieścia cztery filtry szklane, na które naniesiono po 10 µl roztworów wzorcowych o stężeniach: 72 µg/ml; 288 µg/ml i 1440 µg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry umieszczono w naczynkach szklanych o pojemności 4 ml, szczelnie zamknięto i umieszczono w chłodziarce (w temperaturze 4°C). Po 4, 8, 12 i 18 dniach przechowywania przeprowadzono analizę sześciu filtrów z każdego stężenia.

Tabela 8. Wyniki badania precyzji metody oznaczania *N*-hydroksymocznika (HM) techniką LC-MS/MS

Table 8. The results of the precision study of the *N*-hydroxyurea(HM) determination method with LC-MS/MS

Numer analizy	Stężenie <i>N</i> -hydroksymocznika, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1	0,36	0,29	1,44	1,35	7,2	7,48
2		0,33		1,40		7,47
3		0,34		1,43		8,98
4		0,33		1,55		7,28
4		0,36		1,76		7,34
6		0,35		1,76		7,74
7		0,36		1,54		7,60
8		0,36		1,66		7,36
9		0,40		1,64		7,71
10		0,39		1,73		7,57
Średnia		0,35		1,58		7,67
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>		0,03		0,15		0,45
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		9,4		9,7		6,4

Tabela 9. Wyniki badania precyzji metody oznaczania *N*-hydroksymocznika (HM) techniką LC-FLD

Table 9. The results of the precision study of the *N*-hydroxyurea (HM) determination method with LC-FLD technique

Numer analizy	Stężenie <i>N</i> -hydroksymocznika, µg/ml					
	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone	zakładane	oznaczone
1	0,36	0,40	1,44	1,36	7,2	6,62
2		0,33		1,37		6,91
3		0,38		1,36		6,89
4		0,39		1,34		6,93
4		0,37		1,39		6,99
6		0,40		1,34		6,92
7		0,39		1,24		7,06
8		0,41		1,19		7,39
9		0,40		1,23		6,94
10		0,41		1,24		7,13
Średnia		0,39		1,31		6,98
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>		0,02		0,07		0,20
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %		6,17		5,52		2,80

Do filtrów dodano 2 ml roztworu mieszaniny do ekstrakcji i poddawano 30-minutowemu wymywaniu za pomocą mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z PTFE o średnicy porów 0,45 μm , a następnie poddawano analizie chromatograficznej w ustalonych wcześniej warunkach (technika LC-MS/MS). Wartości pól powierzchni pików badanego związku uzyskane z analiz ekstraktów porównano z wynikami analiz ekstraktów wzorców *N*-hydroksymocznika o takich samych stężeniach przygotowanych w dniu analizy.

Wyniki badań warunków przechowywania pobranych próbek *N*-hydroksymocznika przedstawiono na rycinie 5. Wyniki wykonanych badań wskazują, że próbki *N*-hydroksymocznika pobrane na filtry z włókna szklanego i przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 18 dni. Wyrażone w procentach średnie wartości współczynnika odzysku dla poszczególnych stężeń *N*-hydroksymocznika na filtrze (0,72 $\mu\text{g}/\text{filtr}$; 2,88 $\mu\text{g}/\text{filtr}$; 14,4 $\mu\text{g}/\text{filtr}$) wynoszą odpowiednio: 104,7%; ($SD - 5,9$); 100,7% ($SD - 5,8$) i 95,8% ($SD - 2,5$). Średnia trwałość przechowywania próbek z pobranym na filtr *N*-hydroksymocznikiem wynosi 100,43% ($SD - 6,0$).

Walidacja metody

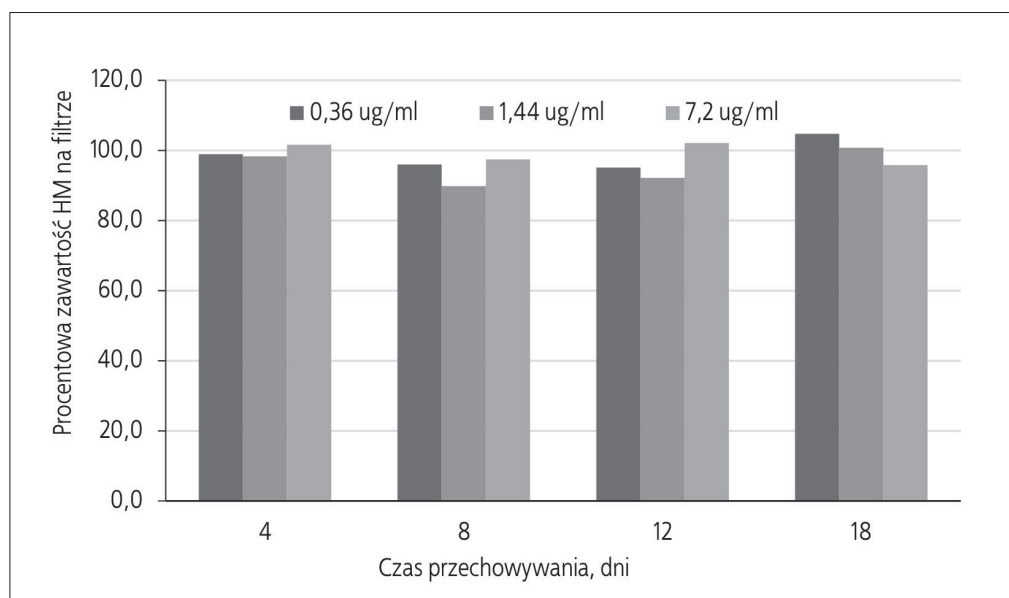
Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej

PN-EN 482:2021-08. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,36 \div 7,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,001 \div 0,02 mg/m^3 dla próbki powietrza 720 l)
- granice wykrywalności: 0,016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LC-MS/MS), 0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LC-FLD)
- granice oznaczalności: 0,053 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LC-MS/MS), 0,003 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LC-FLD)
- współczynniki korelacji: $r = 0,9991$ (LC-MS/MS), $r = 0,9990$ (LC-FLD)
- niepewność rozszerzona metody: 28,4% (LC-MS/MS), 29,0% (LC-FLD).

PODSUMOWANIE

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania *N*-hydroksymocznika (HM) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas lub detekcją fluorescencyjną. Wskazania tandemowego spektrometru mas oraz detektora fluorescencyjnego w funkcji stężenia



Rycina 5. Badanie trwałości próbek *N*-hydroksymocznika (HM) przechowywanych w chłodziarce

Figure 5. Stability testing of *N*-hydroxyurea (HM) samples stored in a refrigerator

N-hydroksymocznika w badanym zakresie stężeń (0,36 ÷ 7,2 µg/ml) mają charakter liniowy. Próbkę powietrza do oznaczeń *N*-hydroksymocznika można pobierać, stosując filtry z włókna szklanego. Zatrzymany na filtrze związek należy ekstrahować mieszaniną acetonitrylu i wody w stosunku 1: 1 z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%). Próbkę pobrane na filtry (przechowywane w chłodziarce) zachowują trwałość co najmniej 18 dni. Obie, alternatywne metody oznaczania *N*-hydroksymocznika

(przedstawione w załączniku) umożliwiają oznaczanie związku w powietrzu na stanowiskach pracy w stężeniach od 0,001 mg/m³, czyli 0,1 obowiązującej wartości NDS.

Zaproponowana metoda, niezależnie od zastosowanej techniki detekcji, jest specyficzna dla *N*-hydroksymocznika wobec: metotreksatu, cyklofosfamidu, 5-fluorouracylu, doksorubicyny, etopozytu, ifosfamidu, docetakselu i paklitakselu.

PIŚMIENNICTWO

- Bonczarowska M., Brzeźnicki S. (2020). 5-Fluorouracyl – frakcja wdychalna. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 2(104), 63–77.
- Bonczarowska M., Mikołajewska K., Brzeźnicki S. (2018). Etopozyd – frakcja wdychalna. Metoda oznaczania w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 2(96), 161–173.
- Brzeźnicki S., Bonczarowska M., Mikołajewska K. (2016). Metotreksat. Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 1(87), 93–108.
- Dias Elias D.B., de Jesus Ponte Carvalho T.M., de Sá Soares J.E. i in. (2014). Standardization method for measurement of hydroxyurea by Ultra High Efficiency Liquid Chromatography in plasma of patients with sickle cell disease. *Braz. J. Pharm. Sci.* 50(3), 621–628.
- Dobecka M. (2017). *N*-Hydroksymocznik – frakcja wdychalna. Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środow. Pr.* 3(93), 55–87.
- Dobecki M. (2000). Walidacja metod badań chemicznych i pyłowych zanieczyszczeń powietrza na stanowiskach pracy. *Podst. Metod. Ocen. Środow. Pr.* 3(25), 5–14.
- ECHA, European Chemical Agency (2023). <https://echa.europa.eu/pl/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/118826> [dostęp: 2023].
- El-Kosasy A.M. (2003). Determination of hydroxyurea in capsules and biological fluids by ion-selective potentiometry and fluorimetry. *Journal of AOAC International.* 86, 1.
- El-Samman F.M. (2018) Spectrophotometric determination of hydroxyurea in pharmaceutical preparations. *Raf. J. Sci.* 27, 4, 29–36.
- Garg U., Scott D., Frazee C. i in. (2015). Isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of hydroxyurea. *Ther. Drug Monit.* 37(3), 325–330.
- Gordon A., Asante S.B., Bukari Y. i in. (2015). Method development and validation for hydroxyurea in fixed oral solid dosage forms using RP-HPLC with DAD detection. *Rajar J.* 7235–7242.
- Kettani T., Cottone F., Gulbis B. i in. (2009). Plasma hydroxyurea determined by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1, 877(4), 446–450.
- Krämer M., Fry H., Kappenstein O. (2021). Development and validation of two analytical methods for urea determination in compound feed, including pet food, and yeast using high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection and tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A.* 38(6), 931–942.
- Legrand T., Rakotosonb M.G., Galactérosb F. i in. (2017). Determination of hydroxyurea in human plasma by HPLC-UV using derivatization with xanthidol. *J. Chromatogr. B* 1, 1064, 85–91.
- Marahatta A., Ware R.E. (2017). Hydroxyurea: analytical techniques and quantitative analysis. *Blood Cells Mol. Dis.* 67, 135–142.
- Micoli G., Turci R., Arpellini M. i in. (2001). Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, 750, 25–32.
- Osytek A., Biesaga M., Przynska K. i in. (2008). Quantification of some active compounds in air samples at pharmaceutical workplaces by HPLC. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70, 1283–1286.
- PN-EN 482: 2021-08 Narażenie na stanowiskach pracy – Procedury oznaczania stężenia czynników chemicznych – Podstawowe wymagania dotyczące parametrów procedur.
- PubChem (2023). National Library of Medicine. Compound summary. Hydroxyurea, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyurea> [dostęp: 14.11.2023].
- Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 9 stycznia 2020 r., zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy z dnia 12 czerwca 2018 r. *DzU 2020*, poz. 61.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (tzw. rozporządzenie CLP). *Dz. Urz. UE L 353 z 31.12.2008 r. z późn. zm.*
- Sivakumar P., Meenakshi S., Govindan P. i in. (2013). Spectrophotometric determination of hydroxyurea and stability in nitric acid medium. *Int. J. Nucl. Energy Sci. Eng.* 3, 2, 27–31.
- Smart L.R., Mwesige C., McElhinney K.E. i in. (2023). Hydroxyurea pharmacokinetics and precision dosing in low-resource settings. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1–9.
- Sottani C., Turci R., Micoli G. i in. (2000). Rapid and sensitive determination of paclitaxel (Taxxol) in environmental samples

by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 930–935.

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

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

Zhou J., Liu C., Chen Y. i in. (2023). Determination of urea in swimming pool water using high-performance liquid chromatography with online postcolumn derivatization by xanthydrol. *J. Chromatogr. Sci.* 61(4), 339–346.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA FRAKCJI WDYCHALNEJ N-HYDROKSYMOCZNIKA NA STANOWISKACH PRACY Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ Z TANDEMOWYM SPEKTROMETREM MAS LUB Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze analitycznej podano metodę oznaczania *N*-hydroksymocznika (numer CAS: 127-07-1) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. Metodę stosuje się podczas kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

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

2. Powołania normatywne

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

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

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

3. Zasada metody

Metoda polega na zatrzymaniu obecnego w badanym powietrzu *N*-hydroksymocznika na filtrze z włókna szklanego, ekstrakcji zatrzymanego związku za pomocą roztworu kwasu mrówkowego i acetonitrylu, a następnie przeprowadzeniu analizy chromatograficznej otrzymanego roztworu z zastosowaniem

wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną.

4. Postanowienia ogólne

4.1. Dokładność ważenia

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

4.2. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

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

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

5. Odczynniki i materiały

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

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

5.2. Acetonitryl o czystości do LC-MS

5.3. *N*-Hydroksymocznik, certyfikowany wzorzec odniesienia

5.4. Roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu

Do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml acetonitrylu wg punktu 6.2, dodać 1 ml kwasu mrówkowego wg punktu 6.1, kolbę

uzupełnić do kreski acetonitrylem wg punktu 6.2. Zawartość kolby wymieszać.

5.5. Roztwór kwasu mrówkowego

Do kolby pomiarowej o pojemności 1000 ml odmierzyć 950 ml wody, dodać 1 ml kwasu mrówkowego wg punktu 6.1, kolbę uzupełnić do kreski wodą. Zawartość kolby wymieszać.

5.6. Roztwór do ekstrakcji

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

5.7. Roztwór wzorcowy podstawowy

N-hydroksymocznika

Do kolby pomiarowej o pojemności 1 ml wg punktu 6.3 odważyć około 10 mg *N*-hydroksymocznika. Substancję rozpuścić w roztworze do ekstrakcji wg punktu 6.6, kolbę uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 6.6. Obliczyć zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml roztworu.

Roztwór przechowywany w chłodziarce (w szczelnie zamkniętym naczyniu) zachowuje trwałość przez 60 dni.

5.8. Roztwór wzorcowy pośredni

N-hydroksymocznika

Do kolby pomiarowej o pojemności 5 ml wg punktu 7.6 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.7 taką ilość roztworu wzorcowego podstawowego *N*-hydroksymocznika, aby końcowe stężenie *N*-hydroksymocznika wynosiło 1440 µg/ml. Kolbę uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 6.6.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

5.9. Roztwory wzorcowe robocze

N-hydroksymocznika

Do ośmiu kolb pomiarowych o pojemności 1 ml wg punktu 7.6 odmierzyć za pomocą pipety wg punktu 6.8 odpowiednio, w mililitrach: 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75 i 1 wzorca pośredniego *N*-hydroksymocznika. Kolby uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji wg punktu 6.6. Stężenia *N*-hydroksymocznika w tak przygotowanych roztworach wynoszą odpowiednio, w mikrogramach na mililitr: 0; 28,8; 72; 144; 288; 720; 1080 i 1440.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

5.10. Propan-1-ol

Stosować propan-1-ol o czystości do HPLC.

5.11. Ksanthydrol

5.12. Roztwór ksanthydrołu w propan-1-olu

Do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml wg punktu 5.11 odważyć ok. 40 mg ksanthydrołu, dodać 7 ml propan-1-olu wg punktu 5.10, a następnie 1 ml wg punktu 5.14 roztworu kwasu solnego. Kolbę uzupełnić do kreski propan-1-olem.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

5.13. Kwas solny (np. 38%, gęstość 1,16 g/ml)

5.14. Roztwór kwasu solnego

o stężeniu 1,5 mol/l

Uwzględniając gęstość i procentowość kwasu solnego, obliczyć zawartość czystego kwasu solnego w 1 ml. Do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml dodać wodę, a następnie odmierzyć 1,22 ml kwasu solnego wg punktu 5.13. Kolbę uzupełnić do kreski wodą i wymieszać.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

Stosować typowy sprzęt laboratoryjny oraz następujący:

6.1. Chromatograf cieczowy

Chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas lub chromatograf cieczowy wyposażony w detektor fluorescencyjny umożliwiający wykonanie analizy przy długości fali wzbudzenia i emisji $\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 308 \text{ nm}$.

6.2. Filtry

Filtry wykonane z włókna szklanego o średnicy 25 mm i średnicy porów 1,6 µm z oprawkami do pobierania frakcji wdychalnej.

6.3 Kolumna chromatograficzna

Kolumna chromatograficzna umożliwiająca oznaczanie *N*-hydroksymocznika w obecności innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.:

- kolumna analityczna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową o średnicy ziaren 1,8 µm, długości 100 mm i średnicy wewnętrznej 2,1 mm,
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupą oktadecylową, o uziarnieniu 5 µm, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 2,1 mm.

6.4. Próbniki

Dostępne w handlu próbники stosować zgodnie z instrukcją producenta, dla których producent

zadeklarował zgodność z zasadami podanymi w normie PN-EN 481 (umożliwiający wyodrębnienie z powietrza frakcji wdychalnej).

6.5. Kolby pomiarowe

Kolby pomiarowe o pojemności: 1 ml; 5 ml i 1000 ml.

6.6. Naczynka

Naczynka szklane (zamykane) o pojemności 2 ml i 4 ml.

6.7. Pipety

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

6.8. Pompa ssąca

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

6.9. Mieszadło mechaniczne

6.10. Filtry strzykawkowe

Filtry strzykawkowe z politetrafluoroetyleny (PTFE).

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z zasadami podanymi w normie PN-Z-04008-7. W miejscu pobierania próbek przez filtr wg punktu 6.2 przepuścić do 720 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości zalecanym przez producenta separatora frakcji (najczęściej 2 l/min) za pomocą pompy wg punktu 6.8. Pobrane próbki przechowywane w chłodziarce zachowują trwałość przez co najmniej 18 dni.

8. Warunki pracy zestawu do chromatografii cieczowej

8.1. Warunki pracy chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać rozdzielanie *N*-hydroksymocznika

od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu.

W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.3a, oznaczenie można wykonać w następujących warunkach:

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

Dopuszcza się stosowanie innych kolumn chromatograficznych lub innego składu fazy ruchomej zapewniających możliwość oznaczenia *N*-hydroksymocznika.

Tandemowy spektrometr mas:

- źródło jonów jonizacja dodatnia
- komora kolizyjna:
 - gaz kolizyjny argon
 - monitorowane przejście reakcji fragmentacji 76,61 m/z do 44,03 m/z – jon kwantyfikujący, 76,61 m/z do 31,12 m/z – jon potwierdzający.

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

Tabela 1. Faza ruchoma o składzie programowanym

Czas, min	Roztwór kwasu mrówkowego wg punktu 6.5, %	Roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu wg punktu 6.4, %
0	85	15
0,2	85	15
4	0	100
4,5	0	100
5	85	15
8	85	15

8.2. Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem fluorescencyjnym

Warunki pracy chromatografu należy dobrać tak, aby uzyskać oddzielenie *N*-hydroksymocznika od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu.

W przypadku stosowania kolumny o parametrach podanych w punkcie 6.3b, oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

- skład fazy ruchomej (tabela 2)
- temperatura kolumny 40°C
- strumień objętości fazy ruchomej 0,3 ml/min
- objętość dozowanej próbki 5 µl
- długość fali wzbudzenia/emisji 240 nm/308 nm.

Dopuszcza się stosowanie innych kolumn chromatograficznych lub innego składu fazy ruchomej zapewniających możliwość oznaczenia *N*-hydroksymocznika.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej do oznaczeń techniką spektrometrii mas

Na siedem filtrów wg punktu 6.2 nanieść za pomocą pipet automatycznych wg punktu 6.6 po 10 µl roztworów wzorcowych roboczych *N*-hydroksymocznika wg punktu 5.9. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.5. Do każdego naczynka dodać po 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła mechanicznego. Zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml tak uzyskanych roztworów wynosi odpowiednio, w mikrogramach: 0; 0,36; 0,72;

1,44; 3,6; 5,4 i 7,2. Uzyskane ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.5, a następnie naczynka szczelnie zamknąć. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach podanych w rozdziale 8.

Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml otrzymanych roztworów, w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchni pików. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Sporządzanie krzywej wzorcowej do oznaczeń techniką fluorescencyjną

Na siedem filtrów wg punktu 6.2 nanieść za pomocą pipet automatycznych wg punktu 6.6 po 10 µl roztworów wzorcowych roboczych *N*-hydroksymocznika wg punktu 5.9. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 6.5. Do każdego naczynka dodać po 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła mechanicznego. Zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml tak uzyskanych roztworów wynosi odpowiednio, w mikrogramach: 0; 0,36; 0,72; 1,44; 3,6; 5,4 i 7,2. Uzyskane ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.5. Z każdego naczynka za pomocą pipety wg punktu 6.7 pobrać po 0,95 ml ekstraktu i przenieść do naczynka o pojemności 2 ml wg punktu 6.5. Do każdego naczynka dodać za pomocą pipety wg punktu 6.7 po 0,05 ml roztworu ksanthydrołu wg punktu 5.12. Naczynka szczelnie zamknąć, wymieszać zawartość i zostawić na 60 min bez dostępu światła.

Tabela 2. Faza ruchoma o składzie programowanym

Czas, min	Roztwór kwasu mrówkowego wg punktu 6.5, %	Roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu wg punktu 6.4, %
0	70	30
5	70	30
6	20	80
10	20	80
10,5	70	30
20	70	30

Sporządzić analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 8. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml otrzymanych roztworów, w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

11. Wykonanie oznaczania techniką tandemowej spektrometrii mas

Po pobraniu próbki powietrza filtr przenieść do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 7.5. Następnie dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i poddać 30-minutowej ekstrakcji za pomocą mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączyć za pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.5. Naczynka szczelnie zamknąć. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach wg rozdziału 8. Zawartość *N*-hydroksymocznika w badanym roztworze odczytać z krzywej wzorcowej, w mikrogramach.

12. Wykonanie oznaczania techniką fluorescencyjną

Po pobraniu próbki powietrza przenieść filtry do naczynek o pojemności 4 ml wg punktu 7.5, dodać 2 ml roztworu do ekstrakcji wg punktu 5.6 i poddać 30-minutowej ekstrakcji przy użyciu mieszadła mechanicznego. Ekstrakty przesączyć za

pomocą filtrów strzykawkowych wg punktu 6.10 do naczynek o pojemności 2 ml wg punktu 6.5. Z każdego naczynka za pomocą pipety wg punktu 6.7 pobrać po 0,95 ml ekstraktu i przenieść do naczynka o pojemności 2 ml wg punktu 6.5. Do każdego naczynka dodać za pomocą pipety wg punktu 6.7 po 0,05 ml roztworu ksanthidrolu wg punktu 5.12. Następnie naczynka szczelnie zamknąć, wymieszać zawartość i zostawić na 60 min bez dostępu światła. Wykonać analizę chromatograficzną w warunkach określonych w rozdziale 8. Zawartość *N*-hydroksymocznika w badanym roztworze odczytać z wykresu krzywej wzorcowej, w mikrogramach.

13. Obliczanie wyniku oznaczania

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

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

w którym:

- C* – zawartość *N*-hydroksymocznika w 1 ml roztworu po ekstrakcji, odczytana z krzywej wzorcowania, w mikrogramach,
- V* – objętość powietrza przepuszczonego przez filtr, w litrach,
- 2 – ilość roztworu użyta do ekstrakcji.

