

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

BIOLOGICKÉ EXPOZIČNÍ TESTY

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitel specialista: ?

Hradec Králové, 2007

Milan Jaňovka

Děkuji členům katedry biochemických věd za ochotu, podnětné názory. Děkuji RNDr.

| Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení a připomínky a pomoc při řešení problémů

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. BIOLOGICKÉ EXPOZIČNÍ TESTY	6
2.1 METODICKÝ NÁVOD.....	6
2.1.1. Základní ustanovení.....	6
2.1.2. Odběr a uchování vzorků.....	7
2.1.3. Analýza vzorků.....	8
2.1.4. Biologické limity.....	9
2.1.5. Hodnocení expozičních testů.....	9
3. BENZEN.....	14
3.1. HISTORIE BENZENU.....	14
3.2. STRUKTURA BENZENU.....	14
3.2.1. Struktura benzenu s delokalizovanými elektrony.....	16
3.2.2. Molekulové orbitály benzenu.....	17
3.3. BENZEN A EXPOZICE BENZENU.....	21
3.3.1. Vstupní cesty.....	21
3.3.2. Distribuce.....	21
3.3.3. Metabolizmus benzenu.....	22
3.3.4. Toxicita benzenu.....	26
3.3.5. Projevy intoxikace benzenem.....	26
3.3.6. Leukemogeneze.....	27

4. BIOLOGICKÉ MONITOROVÁNÍ EXPOZICE BENZENU V REÁLNÉM ČASE.....	28
4.1. STANOVENÍ FENOLU V MOČI FOTOMETRICKY.	28
4.1.1. Přístrojové vybavení pro stanovení fenolů v moči.....	30
4.1.2. Princip paprskového spektrofotometru UV-VIS.....	31
4.2. ANALÝZA KYSELINY S – FENYLMERKAPTOURVÉ (PMA) V MOČI.....	33
4.2.1. Princip analýzy PMA.....	33
4.2.2. Postup imunochemické analýzy.....	36
4.2.3. Odběr vzorku.....	36
4.2.4. Výpočet koncentrace kyseliny fenylmerkapturové a uvádění výsledků.....	38
5. STANOVENÍ KYSELINY AMINOLEVUOVÉ (δ ALA)..	40
5.1. PRINCIP STANOVENÍ δ ALA.....	40
5.2. CHROMATOGRAFICKO KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ δ ALA A PORFOBILINOGENU (PBG) V MOČI.....	42
5.2.1. Stanovení PBG.....	44
6. ZÁVĚR.....	47
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	48

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce pojednává o stanovení biologických expozičních testů což je metoda k posouzení expozice pracovníků pracujících v rizikovém prostředí. Zabývá se popisem metabolismem em škodlivin a přístrojovým ého vybavením k jejich detekci.

Naformátováno: Zarovnat do bloku

2. BIOLOGICKÉ EXPOZIČNÍ TESTY

2.1. METODICKÝ NÁVOD HODNOCENÍ A PROVÁDĚNÍ EXPOZIČNÍCH TESTŮ

2.1.1 Základní ustanovení

K zajištění jednotného postupu při provádění a hodnocení testů byl vydán § 71 odst. 3 zákona č. 20/1966 Sb., o péči o zdraví lidu tento metodický návod :

- 1) Expoziční testy slouží k posouzení expozice jednotlivých osob a kolektivů chemickým látkám na základě stanovení koncentrace těchto látek, jejich metabolitů nebo jiných indikátorů expozice v biologickém materiálu.
- 2) Při provádění hygienického dozoru na pracovištích se expoziční testy využívají jako jeden z míry ukazatelů pracovního rizika a stavu pracovního prostředí.
- 3) Příslušný orgán hygienické služby nařizuje provedení expozičních testů jednorázově nebo opakovaně v těch případech, kdy je to potřebné pro posouzení expozice jednotlivých pracovníků nebo pro posouzení hygienické situace na pracovišti.
- 4) Lhůty opakovaně prováděných expozičních testů stanoví příslušný orgán hygienické služby. Zpravidla 1 x za rok pro pracoviště a práce zařazené do kategorie 1 a 2, 2 x za rok pro kategorii 3 a 4 x za rok pro kategorii 4¹⁾.

- 5) Expoziční testy se s vyšetřováním koncentrace škodlivých chemických látek v pracovním ovzduší navzájem doplňují.
- 6) Expoziční testy, které jsou součástí preventivních lékařských vyšetření pracujících se provádějí podle platných předpisů pro tato vyšetření²⁾.

2.1.2. Odběr a uchování vzorků

- 1) Při odběru vzorků se dává přednost neinvazivním metodám, pokud se tím výrazně nesnižuje výpovědní hodnota testu.
- 2) Při celosměnové expozici se pro stanovení látek s krátkým poločasem vylučování, tj. do 50ti hodin, vzorky moči nebo krve odebírají na konci směny, nejlépe v druhé polovině pracovního týdne. U látek s poločasem vylučování delší než padesát hodin lze vzorky odebírat v libovolnou dobu.
- 3) Při expozicích, které netrvají celou směnu, určí dobu odběru vzorku odborný pracovník hygienické služby podle místních podmínek ; zpravidla se odběr provádí po skončení expozice.
- 4) Čtyřhodinové vzorky moči se získávají na konci směny tak, že se nashromáždí veškerá moč včetně porce z konce směny. Před započítáním odběrů vzorku moči 4 hodiny před koncem směny se vyšetřovaná osoba vymočí ; tato moč se neanalyzuje.
- 5) Přehled specifických podmínek pro odběr a uchování vzorků je uveden v příloze č. 1 k tomuto metodickému návodu.
- 6) Ke shromáždění vzorků moči se používá pečlivě vymytých přiměřeně velkých nádob (250 – 500ml) z umělé hmoty se šroubovacím uzávěrem, popřípadě nádob pro jedno použití.
- 7) Není-li možno vzorky zpracovat v den odběru uchovávají se při 4°C a zpracují se nejpozději do sedmi dnů, není-li v příloze nebo pracovním návodu uvedeno jinak.

- 8) Při převážení většího množství vzorků nebo jejich zasílání poštou je možno po promíchání moči a změření jejího objemu případně pro stanovení její hustoty, odebrat pro její zpracování jen potřebnou část, obvykle 25ml. Vzorky se přepravují za chladu.

2.1.3 Analýza vzorků

- 1) Při provádění analýz vzorků se postupuje podle metod vyhlášených hlavním hygienikem ČR za standardní³⁾.
- 2) Pokud pro některé chemické látky není k dispozici standardní analytická metoda nebo je k dispozici jiné přístrojové vybavení, lze použít jinou metodu ke konzultaci s referenční laboratoří pro expoziční testy.
- 3) Výsledky analýz moči se vyjadřují :
 - a) jako podíl koncentrace indikátoru v moči (mg/l, μmol/l) a koncentrace endogenního kreatininu stanoveného ve stejném vzorku moči (g/l, mmol/l) nebo
 - b) jako množství indikátoru (ng, pmol) vyloučené za jednotku času (s) v přepočtu na 1Kg tělesné hmotnosti vyšetřované osoby nebo
 - c) jako koncentrace indikátoru v moči (ml/l, μmol/l) korigovaná na standardní hustotu moči (1,024) podle vzorce
$$C_k = \frac{24 * C_n}{1000 * (H_n - 1,000)}$$

C_k – korigovaná koncentrace
 C_n – nalezená koncentrace
 H_n – nalezená hustota moči při 20°C
- 4) Vzorky moči o hustotě nižší než 1,011 nebo o koncentraci kreatininu nižší než 0,75 g/l, resp. 6,63 mmol/l nejsou pro hodnocení vhodné a odběr je nutné opakovat.

- 5) Vzoroky uchovávané za nižší teploty se před analýzou temperují na teplotu místnosti.

2.1.4 Biologické limity

- 1) Biologický limit je hodnota indikátoru, která odpovídá takové úrovni expozice chemické škodlivině při níž je podle současných vědeckých znalostí poškození zdraví exponované osoby nepravděpodobné.
- 2) Biologické limity se stanovují na základě dlouhodobých sledování zdravotního stavu osob exponovaných chemické škodlivině, případně se odvozují z nejvyšších přípustných koncentrací škodlivin pro pracovní ovzduší na základě kinetických studií. Biologické limity se stanovují s bezpečnostním koeficientem, neboť netvoří hranici mezi bezpečnými a nebezpečnými expozicemi.
- 3) Biologické limity jsou vyhlašovány hlavním hygienikem ČR.
- 4) Návrhy na vyhlášení biologických limitů se předkládají hlavnímu hygienikovi ČR prostřednictvím pracovní skupiny pro nejvyšší přípustné koncentrace chemických škodlivin a pro chemické karcinogeny při poradním sboru hlavního hygienika ČR pro obor hygiena práce.
- 5) Biologické limity v čtyřhodinové moči z konce pracovní doby jsou uvedeny v příloze číslo 2 a 3 k tomuto metodickému návodu.

2.1.5 Hodnocení expozičních testů

- 1) Hodnocení expozičních testů provádí lékař komplexně s přihlédnutím k ostatním hygienickým ukazatelům zejména k výsledkům stanovení koncentrace škodlivin v pracovním ovzduší a zdravotnímu stavu pracovníků.

- 2) Výsledky expozičních testů jsou jedním z podkladů pro hodnocení míry rizika při práci a lze je využít i jako součást celkového klinického vyšetření jednotlivce.
- 3) Výsledky expozičních testů se porovnávají s biologickými limity. Při překročení biologického limitu je třeba se zabývat příčinami zvýšené expozice. Překročení biologického limitu nelze obecně považovat za příznak intoxikace.
- 4) V případě velkých individuálních rozdílů u souboru expozičních testů pracovního kolektivu nebo rozporu s výsledky vyšetření koncentrace škodlivin v pracovním ovzduší je třeba se zabývat příčinami těchto rozdílů.
- 5) V případě, že je to pro hodnocení výsledků potřebné, nařídí příslušný orgán hygienické služby opakované vyšetření, zpravidla ve lhůtě do 14 dnů po prvním vyšetření.
- 6) Výsledek vyšetření vzorků moči se považuje za podlimitní, jestliže je kterýkoliv ze zvolených způsobů vyjádřením (2.1.3.3 a-d) pod limitem.

Tabulka 1. Odběr a uchování vzorků biologického materiálu

Indikátor	Materiál/ objem ml	Poznámky k článku 2.1.2
Acetylcholinesterázy	K 2	Do zkumavky s 0,1ml heparinu odběr ze žíly. Přeprava za chladu. Ihned zpracovat.
p-Aminofenol	M 25	
5-Aminolevuát	M 25	Konzervace 0,1ml kys. Octová/ 10ml, pH<6.
Arsen	M 100 – 200	Celosměnová moč
Fenol	M 25	
Fluoridy	M 25	
Hemoglobin	K 0,2	Zhemolizovat vodou do 10ml.
Hippurát	M 25	
Cholinesterázy	K 2	Zpracovává se po 0,01 séra. Ihned zpracovat.
Jodazidový test	M 25	
Kadmium	M 25	
Karbonylhemoglobin	K 1	3 heparizované kapiláry 0,02 - 0,03ml krve uzavřít plastelínou, aby nezůstaly bublinky vzduchu.
Koproporfyryn	M 25	Konzervace 0,5g Na ₂ CO ₃ /100ml a 0,2g Na ₂ EDTA/100ml nebo uchovávat ve tmě při -20°C.
Mandelát	M 25	
Metanol	M 25	
Metylhippurát	M 25	
Nikl	M 25	
Oxid uhelnatý	K 5	Naplnit agultinační zkumavku s 0,1 heparinu po zátku.

Pentachlorfenol	M 25	Roztokem NaOH upravit pH=10
Polychlorované bifenylly	K 2	Do zkumavky s 0,2ml heparinu.
Porfobilinogensyntetáza	K 2	
Rtuť	M 25	

*M-moč, K-krev

Tabulka 2 Biologické limity v čtyřhodinové moči z konce pracovní doby.

Škodlivina	Indikátor	h= 1,024		Limity v moči po přepočtu na Kreatinin		Čas a hmotnost	
		mg/l	μmol/l	mg/g	μmol/mmol	ng/s*Kg	pmol/s*Kg
Anilin	p-Aminofenol	40,00	370,00	26,00	25,00	80,00	73,00
Arsen	Arsen	0,20	2,70	0,13	0,20	0,04	0,54
Benzen	Fenol	30,00	320,00	19,00	22,00	6,00	64,00
Etylbenzen	Mandelát	1000,00	6600,00	640,00	470,00	200,00	1300,00
Fenol	Fenol	70,00	750,00	25,00	55,00	14,00	150,00
Fluoridy	Fluorid	3,00	160,00	2,00	11,00	0,60	32,00
Fural	Pyrosolizan	130,00	1200,00	84,00	87,00	26,00	240,00
Kadmium	Kadmium	0,02	0,14	0,01	0,01	0,00	0,03
Metanol	Metanol	2,5*	75*				
Nikl	Nikl	0,03	0,52	0,02	0,36	0,01	0,11
Olovo	5-aminolevuát	20,00	160,00	13,00	11,00	4,00	31,00
Pentachlorfenol	pentachlorfenol	2,00	7,50	1,30	0,55	0,40	1,50
Rtuť(anorg.)	rtuť	0,10	0,50	0,06	0,04	0,02	0,10
Sírouhlík	-sh=cs skupiny	E=c*logt,c=koncentrace kreatininu t=čas					
Styren	Mandelát	300,00	2000,00	200,00	150,00	60,00	400,00
Toluen	Hippurát	2500,00	14000,00	1600,00	11000,00	500,00	2800,00
Xyleny	Metylhippurát	1400,00	7300,00	900,00	530,00	280,00	1500,00
* celosměnová moč, nekoriguje se.							

Tabulka 3 Biologické limity v krvi

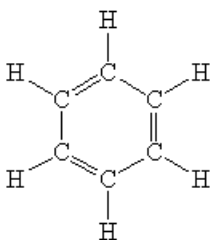
Škodlivina	Indikátor	Limity v krvi
Anilín	Hemoglobin	0,02 mol/mol Hb
Inhibitor cholinesterázy	Aktivita cholinesterázy	Pokles o 20% z hodnoty před započítím práce.
Metylrtuť	Rtuť*	0,05mg/l = 0,25 μ mol/l
Nitrobenzen	Hemoglobin	0,02mol/mol Hb
Oxid uhelnatý	Karboxylhemoglobin	0,05mol/mol Hb
Olovo	Aktivita porfobilinogen syntházy	0,1 μ kat
Polychlorované bifenyle	Polychlorované bifenyle	0,05mg/l

*doba odběru nerozhoduje

3. BENZEN

3.1 Historie benzenu ⁴

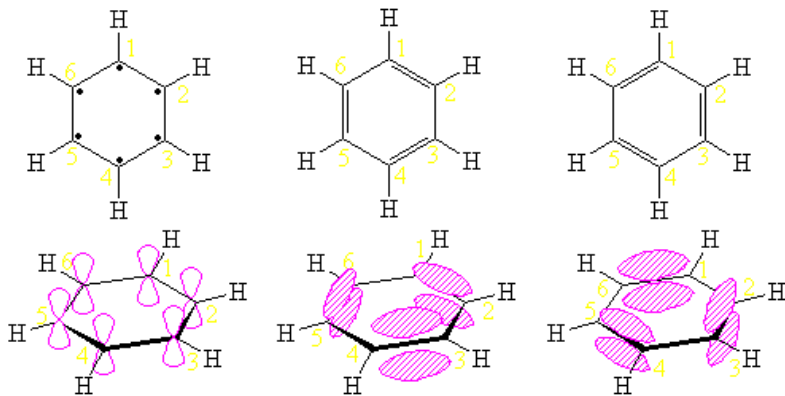
Studium aromatických sloučenin začalo po objevení benzenu roku 1825 Michaellem Faradayem, který jej izoloval ze stlačeného plynu získaného pyrolýzou velrybího tuku. Roku 1834 Eilhardt Mitscherlich připravil benzen zahříváním benzoové kyseliny s oxidem vápenatým. Měřením hustoty par zjistil, že benzen má molekulový vzorec C_6H_6 . Nejznámější a dnes jeden ze dvou nejpoužívanějších vzorců benzenu navrhl roku 1865 August Kekulé:



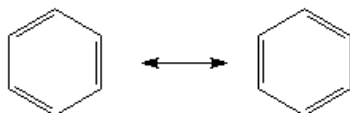
3.1.2 Struktura benzenu

Teorie rezonance

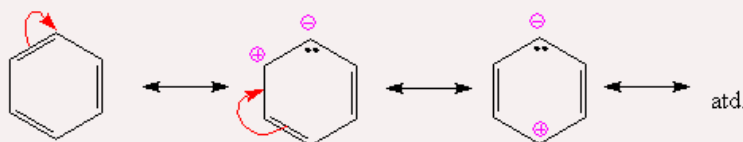
Uvažme Kekuleho strukturu benzenu a podívejme se, jak zde vypadají vazby. Základem molekuly je skelet tvořený σ vazbami vzniklými překryvem s a sp^2 orbitalů ($H-C$) nebo vzájemným překryvem sp^2 orbitalů ($C-C$). Kromě toho je na každém uhlíkovém atomu jeden elektron v p orbitalu, jehož osa je kolmá na rovinu kruhu. Podle Kekulého představ by překryvem sousedních dvojic těchto orbitalů vznikaly klasické vazby π . A zde se dostáváme k jádru problému: Které sousední dvojice orbitalů se mají překrývat? Jsou dvě možnosti: 1+2, 3+4, 5+6 nebo 2+3, 4+5, 6+1:



U benzenu samotného to samozřejmě nemá na nic vliv, jednalo by se stále o tu stejnou molekulu. Avšak i co se týká benzenu substituovaného ve dvou posledních, ukázalo se, že všechny reakce, jejichž cílem je syntéza dvou různých izomerů, končí vždy stejným produktem. To Kekulé vysvětlil tím, že obě formy velmi rychle přecházejí jedna v druhou. Tomuto jevu se začalo říkat rezonance. (Jak uvidíme dále, neodpovídá tento popis skutečnosti.) Krajní struktury se podle toho nazývají rezonanční struktury. Považují se za zcela ekvivalentní, což se vyjadřuje obousměrnou šipkou \longleftrightarrow (nezaměňovat s dvojitou oboustrannou šipkou \rightleftharpoons používanou pro rovnovážnou reakci!!!). V tomto duchu by pak správný zápis struktury benzenu vypadal takto:



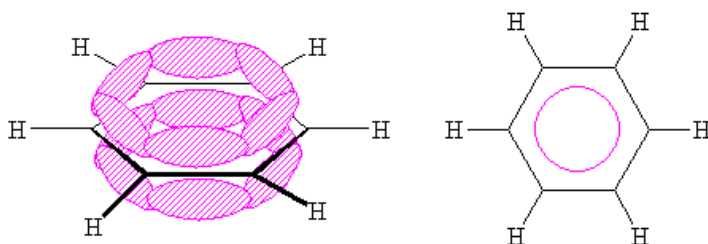
Toto ovšem nejsou jediné možné rezonanční struktury benzenu. Resonanční struktury lze vytvářet v podstatě libovolným možným přesunem π (a p) elektronů. Takže i následující jsou (nepravděpodobné) rezonanční struktury benzenu:



V zápisu reakčních mechanismů se většinou použije pouze jedna z těchto struktur s tím, že si každý domyslí, jak molekula ve skutečnosti vypadá. Pro některé složitější částice je možno uvést velké množství rezonančních struktur. Podle počtu uvažovatelných rezonančních struktur lze často odhadovat stabilitu dané částice (tzn. čím více, tím stabilnější). Ani jedna rezonanční struktura nevyjadřuje skutečný stav. Ten je lineární kombinací všech možných rezonančních struktur.

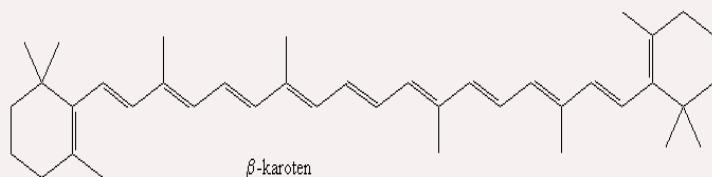
3.2.1. Struktura s delokalizovanými elektrony

Měřením pomocí elektronové difrakce se zjistilo, že všechny vazby C—C v benzenu mají stejnou délku. Zatímco standardní jednoduchá vazba C—C je dlouhá 154,1 pm a dvojná vazba C=C 133,7 pm, vazba mezi uhlíkovými atomy v benzenu má délku 139,5 pm. Již to nasvědčuje tomu, že vazby v benzenu jsou "něco mezi jednoduchou a dvojnou vazbou". Ve skutečnosti opravdu benzen neobsahuje izolované jednoduché a dvojně vazby, ale π elektrony jsou delokalizovány nad a pod rovinou kruhu do elektronového oblaku ve tvaru jakéhosi dvojitého prstence. Právě tento prstenec je reprezentován kruhem uprostřed vzorce:



Toto uspořádání elektronů do kruhu bylo potvrzeno i protonovou NMR.

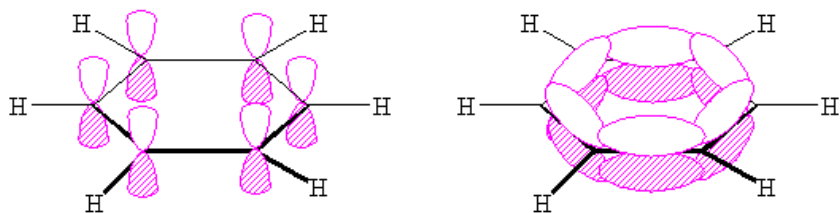
Bude dobré na tomto místě upozornit na podobnost s dlouhými vícenenasycenými řetězci s konjugovanými dvojnými vazbami, jako je například β -karoten:



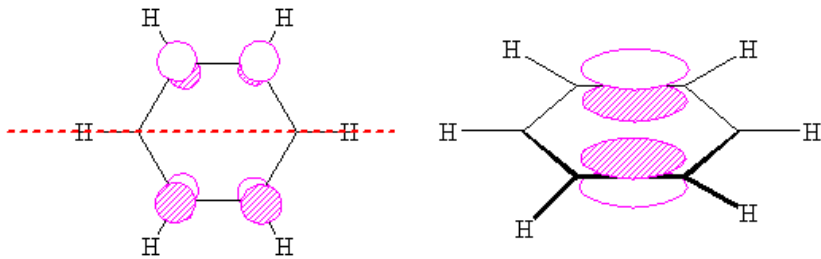
V těch se totiž také vlivem konjugace vazeb a s ní související delokalizace elektronů délka jednoduchých vazeb zkracuje a délka dvojných vazeb prodlužuje, zvláště uprostřed řetězce. Ve světle tohoto faktu je možno na benzen nahlížet jako na jakýsi **extrémněextrémně** konjugovaný vícenenasycený cyklický systém. Ale pozor, jak uvidíme dále, chemické vlastnosti benzenu se jinak alkenům moc nepodobají.

3.2.2. Molekulové orbitály benzenu ⁵

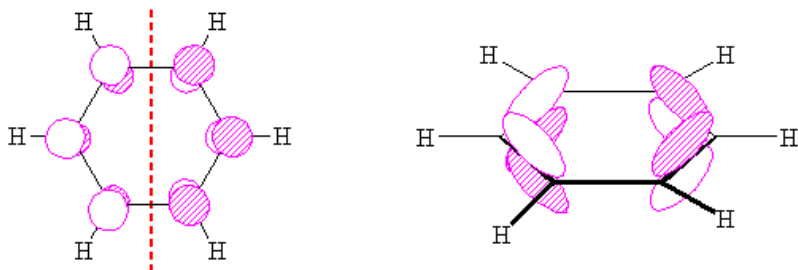
Z šesti po jednom elektronu zaplněných atomových p orbitalů benzenu vznikne lineární kombinací (LCAO = Linear Combination of Atomic Orbitals) dohromady šest molekulových orbitalů π . Nejnižší molekulový orbital vznikne kombinací všech šesti souhlasně orientovaných atomových orbitalů:



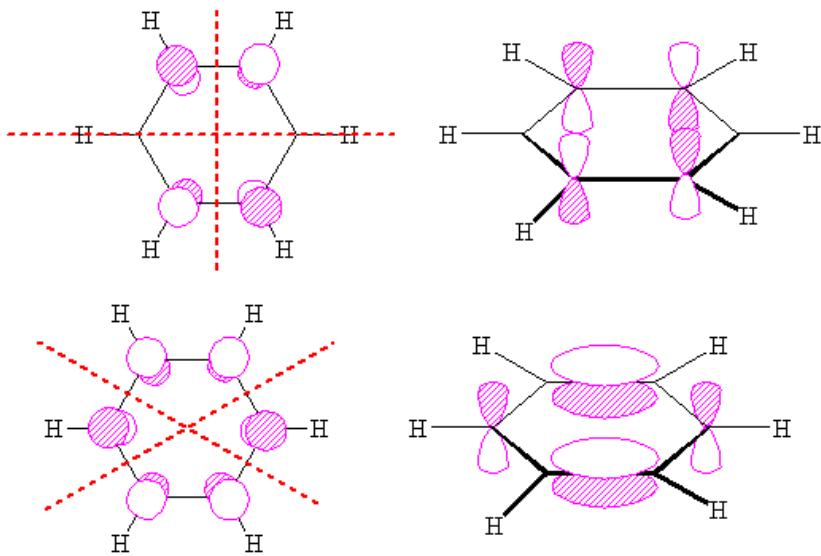
Další vyšší molekulový orbital by měl mít jednu nodální = uzlovou rovinu (počítejme nyní jen uzlové plochy kolmé na rovinu kruhu). Ta však může procházet buď atomovými jádry,



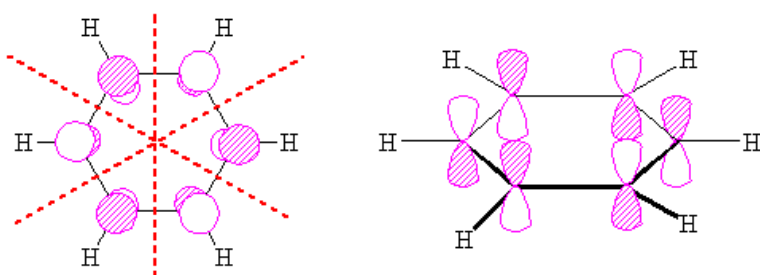
nebo středy vazeb:



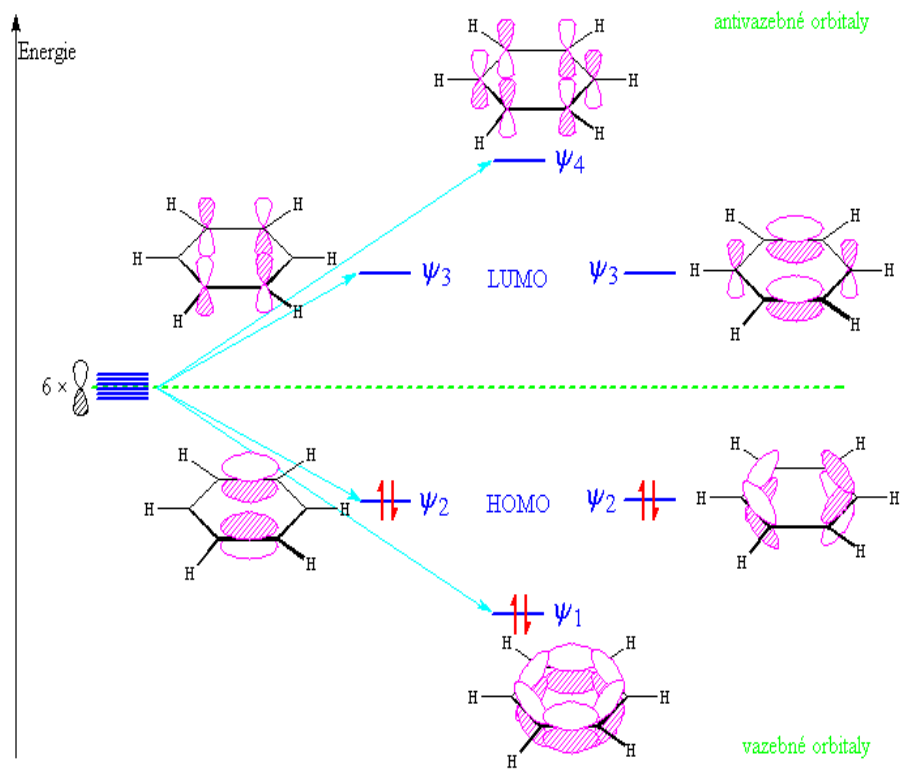
Oba tyto orbitaly jsou degenerované, tzn. mají stejnou energii. Další (vzhledem ke vzrůstající energii) orbitaly mají dvě uzlové roviny a opět nám vychází dva degenerované orbitaly:



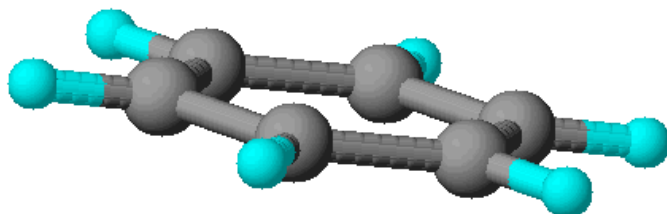
Poslední orbital, s nejvyšší energií, má tři uzlové plochy, je kombinací atomových orbitalů π , u nichž se orientace (\sim znaménko vlnové funkce) pravidelně střídá:



Podívejme se nyní na energetický diagram benzenového π -systému. Orbitaly se zaplňují odspodu (tzn. orbitaly s nejnižší energií jako první = "výstavbový princip"), každý maximálně dvěma elektrony, s opačným spinem ("Pauliho princip"). Vidíme, že se všechny vazebné π orbitaly zaplní a antivazebné zůstanou prázdné. Nevazebné π orbitaly (tzn. molekulové orbitaly se stejnou energií, jakou měly původní atomové orbitaly) v benzenu nejsou:



(HOMO = Highest Occupied Molecular Orbital = nejvyšší obsazený molekulový orbital; LUMO = Lowest Unoccupied Molecular Orbital = nejnižší neobsazený molekulový orbital)



3.3. Benzen a expozice benzenu

Benzen je zařazen podle International Agency for Cancer Research do první skupiny k-ancerogenů. Zdrojem znečištění prostředí benzenem je průmyslová výroba (výroba ropných produktů, koksování uhlí, výroba aromatických uhlovodíků), užívání benzenu jako intermediálního chemického produktu a užívání výrobků, které jej obsahují (např. benzín)

3.3.1. Vstupní cesty

Vstupní cestou do lidského organismu jsou především dýchací cesty. Tedy kontaminace vzduchu hraje velkou roli na rozdíl od ostatních možných zdrojů: jídlo, voda, kontakt látek s kůží. Koncentrace benzenu v ovzduší se pohybují od $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ve venkovských oblastech až po $349 \mu\text{g}/\text{m}^3$ v průmyslových oblastech s vysokou hustotou automobilové dopravy. Během tankování pohonných hmot koncentrace dosahují až $10 \text{mg}/\text{m}^3$. Ve vnitřních prostorách budov se koncentrace pohybuje až okolo $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$. U kuřáků se denní expozice pohybuje kolem $1800 \mu\text{g}/\text{den}$ na rozdíl od nekuřáků s $50 \mu\text{g}/\text{den}$. Časově vážené expozice v souvislosti se zaměstnáním dosahují hodnot až $15 \text{mg}/\text{den}$ (6).

3.3.2. Distribuce

Distribuce benzenu v tkáních po inhalaci $170\text{-}202 \text{mg}/\text{m}^3$ benzenu po 4 hodiny s asi 30% zadrženého benzenu (40-50% se vyloučí zpět plicemi (7)) byla (bez rozdílu mezi pohlavími, zjištěno autopsií): $20 \text{mg}/\text{l}$ v krvi, $390 \text{mg}/\text{l}$ v mozku, $16 \text{mg}/\text{l}$ v játrech a $22 \text{mg}/\text{l}$ v tukové tkáni břicha. Podle studií na potkanech

koncentrace dosahují zlomků těchto hodnot při dermální nebo perorální expozici (6).

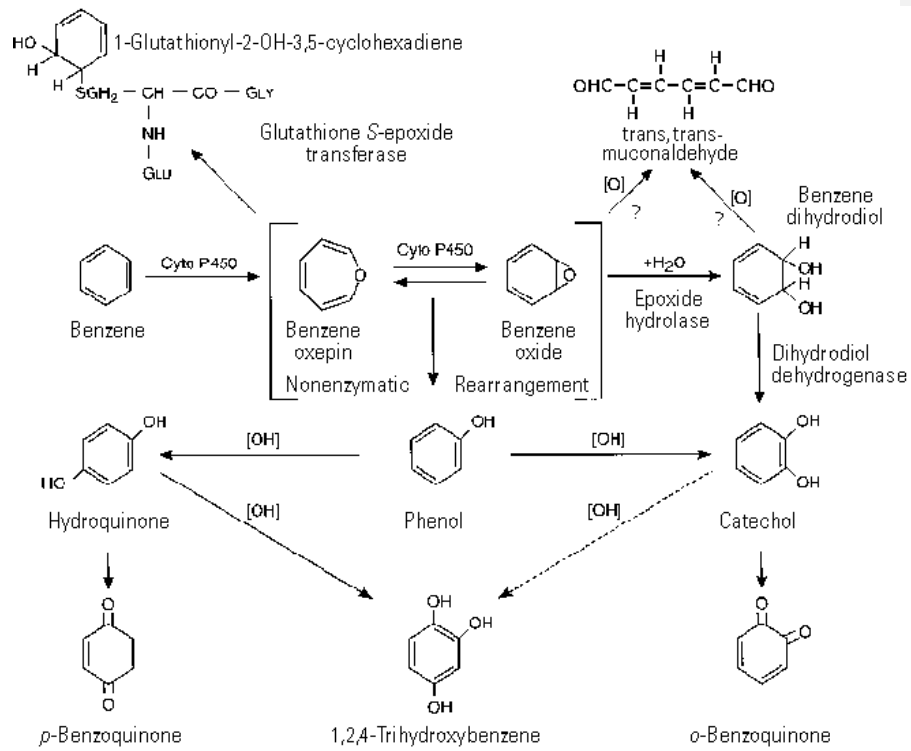
3.3.3. Metabolismus benzenu

Metabolismus benzenu hraje významnou roli pro vznik mutagenních a karcinogenních substancí. Přeměna benzenu probíhá především v jaterních buňkách. Nejdřív přicházejí na řadu oxidativní procesy. První krok oxidace má dvě varianty. První ukazuje obrázek 2: za přítomnosti cytochromu P450 (CYP450), především jeho formy CYP2E1 (8), a NADPH dochází k hydroxylaci benzenu na fenol. Druhá varianta je mnohem komplexnější a ukazuje ji obrázek 3: opět za přítomnosti CYP450 dochází ke vzniku vyváženého komplexu benzen-oxepinu a benzen-epoxidu. Z tohoto komplexu neenzymatickou cestou vzniká fenol a za přítomnosti epoxidhydrolázy vzniká benzendihydrodiol, ze kterého dehydrogenací vzniká katechol. Hydroxylací fenolu vznikají opět katechol a hydrochinon. Katechol je přeměněn na *o*-benzochinon. Přeměna katecholu na 1,2,4-trihydroxybenzen není plně prokázána. Další reakce, kterým podléhá hydrochinon, probíhají za přítomnosti redukujících se flavoproteinů a glutathionu. Vznikají různé meziprodukty s kyslíkovými radikálovými skupinami. Reakce směřují ke vzniku *p*-benzochinonu a 1,2,4-trihydroxybenzenu. Další substancí, která vzniká z benzen-epoxidu nebo benzen-dihydrodiolu otevřením aromatického kruhu je *trans,trans*-muconaldehyd, jehož koncové aldehydicke skupiny se souborem reakcí mění buď obě na skupiny alkoholové (1,6-dihydroxy-2,4-*t,t*-hexadien) nebo karboxyhydroxylové (kyselina mukonová) nebo molekula má kombinaci obou typů koncových skupin (6-hydroxy-2,4-*t,t*-hexadienová kyselina). (6,9)

Alternativní vznik fenolu

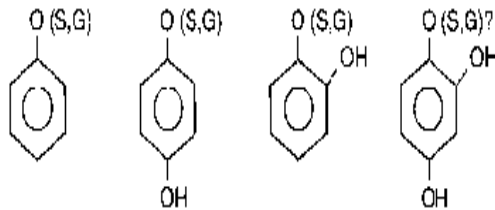


Intermediární metabolismus benzenu, upraveno podle (6,9)

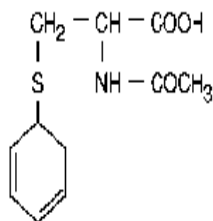


Dalším procesem je konjugace. Vznikají konjugáty s kyselinou glukuronovou, sírovou a merkapturovou .

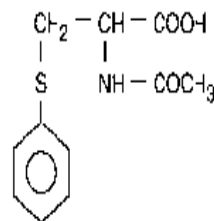
1. Glucuronide and sulfate conjugates



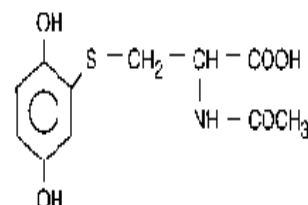
2. Mercapturic acids



6-N-acetylcysteinyl-S-2,3-cyclohexadienol

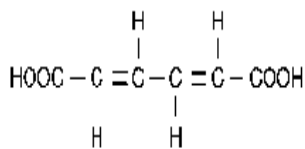


Phenylmercapturic acid

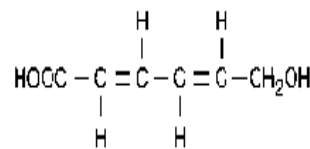


2,5-DiOH-phenylmercapturic acid

3. Ring-opened metabolites

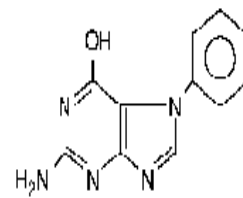


trans-trans-Muconic acid



6-OH-t,t-2,4-hexadienoic acid

4. DNA adduct residues



*N*⁷-phenylguanine

3.3.4. Toxicita benzenu

Charakteristická toxicita benzenu je podmíněna vznikem metabolitů schopných poškozovat strukturu proteinů a DNA alkylací. Tuto schopnost mají *p*-benzochinon a hydrochinon (zvláště v součinnosti s mukonaldehydem [9,10]). Přesný mechanismus působení jiných látek než reaktivního *p*-benzochinonu není znám, ale zdá se, že tato molekula je zodpovědná za velkou část toxických účinků benzenu. Váže se na proteiny mikrotubulů dělicího vřeténka a tím inhibuje buněčnou replikaci. K poškození DNA dochází dvěma mechanismy. První je přímá alkylace za přítomnosti oxidačních látek. Druhý spočívá ve zvýšeném potenciálu vzniku oxidativního stresu během vzniku *p*-benzochinonu z hydrochinonu, který má za následek přímou oxidaci molekul DNA. Alkylace DNA probíhá na bázích, vznikají molekuly, které ukazuje obrázek 5, jejichž rezidua jsou zjizitelné i v moči.

K poškození dochází především v kostní dřeni, která se vyznačuje vysokou proliferační aktivitou buněk a zároveň schopností aktivovat hydrochinon, který přichází z jater ve větším množství než *p*-benzochinon (konjugace). Selektivita působení na kostní dřeň souvisí se zvýšenou aktivitou peroxidázy v poměru k snížené aktivitě NAD(P)H:chinonoxidoreduktázy (NQO1) v makrofázích.

3.3.5. Projevy intoxikace benzenem

Příznaky akutní intoxikace závisí na koncentraci a na délce expozice při inhalaci. Znamky intoxikace jsou deprese CNS, srdeční arytmie, eventuální asfyxie a respirační insuficience u těžkých intoxikací. Lehčí intoxikace CNS jsou plně reversibilní a nejsou důkazy svědčící pro trvalé

poškození mozku. Při perorálním požití je letální dávka asi 10 ml (8,8g). Příznaky zahrnují: vrávoravou chůzi, zvracení, mělký a rychlý puls, somnolenci, bezvědomí, delirium, pneumonitis, hlubokou depresi CNS, kolaps. Subletální dávky způsobí: závratě, euforii, bledost, dušnost, bolest hlavy, únavu, spavost, strach z blížící se smrti. Benzen může způsobit ulcerace sliznic gastrointestinálního traktu (6). Další symptomy jsou hemoglobinurie, akutní poškození kostní dřeně spojené s trombocytopenií, anemií a leukopenií (11).

Příznaky chronické expozice jsou rozmanité. U lidí exponovaných koncentracím od 40 do 3500 mg/m³ v období delším než 3 měsíce se vyskytují příznaky z útlumu kostní dřeně až aplastické anemie (pancytopenie, hemoragická diatéza, náchylnost k infekcím, atd.). K účinkům na imunitní systém dochází již při nižších koncentracích. Dochází ke změnám v získané humorální i buněčné imunitě. V krvi jsou prokazatelné leukocytární aglutininy, ztráty leukocytů, cirkulující protilátky, dále změny ve složení Ig (více IgM a méně IgG a IgA). Také může být zvýšená vnímavost k alergiím. Vliv na snížení plodnosti mužů a teratogeneze, na rozdíl od fetotoxicity, nebyly prokázány (6).

3.3.6. Leukemogeneze

Benzen je karcinogem kostní dřeně. Dochází k poruchám buněk myeloidní řady (viz metabolismus a toxicita benzenu). Klinické jednotky vznikající na základě těchto poruch jsou myelodysplastický syndrom (preleukemie) s možností vzniku akutní myeloidní leukemie (AML). Další krevní malignity, které mohou vznikat, jsou maligní lymfomy, mnohočetný myelom a z nemaligních poruch paroxysmální noční hemoglobinurie. U těchto ostatních typů onemocnění kostní dřeně/krve ale nebyla prokázána kauzální souvislost s intoxikací benzenem (např. mnohočetný myelom [12]) nebo objasňující studie nebyly provedeny. V

úvahu přichází nepoznaná součinnost s jinými látkami, kterým byly dané osoby exponovány, nebo jiné, např. genetické faktory (7,6,9,13). Proces leukemogeneze (13) je v principu podobný podrobně poznanému procesu karcinogeneze u kolorektálního karcinomu, kde jde o sekvenci mutací genů/chromozomů, jejímž následkem je prohlubování malignity mutovaných buněk.

4. BIOLOGICKÉ MONITOROVÁNÍ EXPOZICE BENZENU V REÁLNÉM ČASE

Při expozičních testech je možno stanovit hladinu fenolu v moči, pro větší specifčnost byla zařazena vyhláškou Ministerstva zdravotnictví ze dne 15. února 2001 mezi ukazatele biologických expozičních testů kyselina S-fenylmerkapturová (S-PMA).

4.1. Stanovení fenolu v moči fotometricky

Kolorimetrické stanovení fenolu v moči.(14)

Princip: Fenol kondensuje s 4-aminoantipyrinem a po následné oxidaci alkalickým ferrikyanidem je vzniklý barevný komplex stanoven fotometricky.

Reagencie:

1. 4-aminoantipyrin	3,0 mmol/l = 0,061g/100 ml pH
10 upravit 0,1 mol NaOH	
2. Ferrikyanid draselný	5,56 mmol/l = 0,183 g /100 ml
dest H ₂ O	
3. Extrakční roztok	n-butanol, dichlormethan 10 : 1
4. Fenolová standarda	50 ,0 mg/100 ml

Roztok fenolové standardy zředit 10 x, tj. 1 díl reagens + 9 dílů dest. vody. (**533,3 umol/l**)

Provedení:

Vlnová délka 460 nm

Teplota 25. st.

zaznamenáme.

Nejdříve změříme hustotěrem moč a hodnotu

Pipetovat do zkumavek:

	Vzorek	Standa rd	Slepá
Moč	0,2 ml	-	-
Zřed. reag.č. 4	-	0,2 ml	-
Destil. voda	-		0,2 ml
Reagens. č. 1	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

Dobře promíchat, dále přidat

Reagens č. 2	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
--------------	--------	--------	--------

Dobře promíchat, nechat 3 min. stát. Dále přidat

Reagens č. 3	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
--------------	--------	--------	--------

Promíchat a centrifugovat při 2500 ot/min 5 min

Odečíst A čirého supernatantu při 460 nm proti dest vodě.

Výpočet:

Koncentrace korigovaná na standardní hustotu moče:

$$(C_n) \quad \frac{A \text{ Vzorku} \quad \times \quad 533,3}{A \text{ Standardu}} = \text{mikromoly fenolu / l}$$

$$C_k = \frac{24 \cdot C_n}{1000 (H_n - 1,000)}$$

C_k = korigovaná koncentrace

C_n = nalezená konc.

H_n = hustota nalezená při 20 st. C.

Poznámka: Stanovení fenolických sloučenin v moči je diagnostickou pomůckou u pacientů se susp. hypertyreosou., diabetem mellitus při hypertyreose a nádorech produkujících katecholaminy. Metoda je vhodná jako screening při susp. intoxikaci benzenem a fenolem.

Vzorek: 24 hod. sběr moči. Pro screening intoxikace benzenem nebo fenolem se sbírá moč 4 hod. před koncem pracovní doby.

Příprava vzorku: moč nutno uschovávat v chladu při 4 – 8 st. C.

Set: SIBAR diagnostici – Perugia Italy

Hodnocení: Limit ve 4 hod moči z konce pracovní doby:

$$70 \text{ mg/l} = 750 \text{ mikromolů/l}$$

Referenční rozmezí: do 80 mikromolů/l

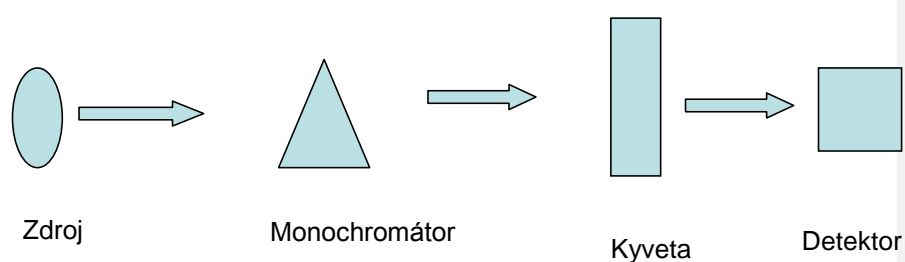
4.1.1 Přístrojové vybavení pro stanovení fenolu v moči – SPEKOL

Pro stanovení se využívá spektrofotometr(15). Je to fotometr, který se liší od filtrového fotometru především spektrální kvalitou záření. Monochromatické záření je získáváno u fotometrů tzv. disperzním zařízením (mřížka nebo hranol), kterým se polychromatické záření zdroje rozloží na spektrum a vymezení úzkého svazku monochromatického záření se děje pomocí vstupní a výstupní štěrbin. Spektrofotometrem se rozumí většinou přístroj, kterým lze automaticky (nebo manuálně) zaznamenat absorbní křivku, tj. závislost absorbance nebo propustnosti na vlnové délce nebo vlnočtu.

Základní prvky spektrofotometru :

- 1) zdroj zářivé energie (žárovka, vývojka), který vyzařuje spojité záření v oboru vlnových délek ležících v ultrafialové a viditelné oblasti spektra
- 2) disperzní zařízení, kterým se polychromatické záření rozkládá do spektra (mřížkový nebo hranolový monochromátor u spektrálních fotometrů, u fotometrů filtr).
- 3) absorbní prostředí – kyveta s měřeným roztokem
- 4) fotoelektrický detektor záření, elektronický zesilovač a měřidlo odečítání hodnot propustnosti nebo absorbance.

Zjednodušené schéma spektrálního fotometru

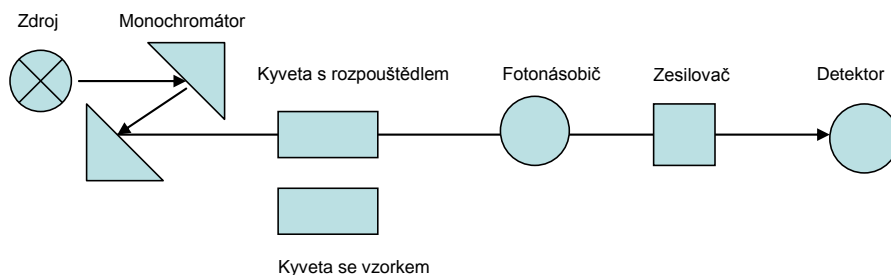


4.1.2. Princip jednopaprskového spektrofotometru UV-VIS(16)

Záření zdroje (kterým je nejčastěji deuteriová výbojka pro UV oblast a halogenová wolframová žárovka pro viditelnou oblast) je soustředěno pomocnou optikou do vstupní štěrbině monochromátoru. Základním požadavkem na zdroj záření spektrofotometru je spojitost emitovaného záření v dané oblasti spektra a stabilita zářivého toku. Monochromátor rozkládá spojitě záření polychromatického záření natáčením disperzní soustavy. Z výstupní štěrbině monochromátoru vychází svazek monochromatického záření o spektrální šířce, dané kvalitou disperzní soustavy (spektrofotometr SPEKOL má spektrální pološířku 10nm). Disperzní soustava je tvořena mřížkou nebo hranolem. Za monochromátorem je kvjeta s měřeným roztokem. Paprsek záření nastavené vlnové délky φ_0 prochází kvjetou, která nejdříve obsahuje referenční čili porovnávací roztok (blenk). Složení referenčního roztoku je totožné jako u roztoku vzorku, kromě stanovované absorbující složky. Z kvjety fotometru vystupuje tok φ , který je poněkud menší než tok dopadající na kvjetu. Tento úbytek záření je způsoben jednak odrazem na optických stěnách kvjety, jednak absorpcí vedlejších látek přítomných v roztoku a rozpouštědlem

samotným. Tok záření dopadá na detektor, kde vyvolá úměrně velký elektrický signál. Tento se zesílí a upraví na jednotkový signál, který se odečte na měřidle. Tak se vymezi horní krajní poloha propustnosti pro daný systém ($T = 1,000 \text{ A} = 0,000$). Spodní krajní hodnota ($T = 0,000 \text{ A} = \infty$) odpovídá stavu při zacloněném detektoru. Po vymezení krajních poloh se obsah kyvety s referenčním roztokem nahradí roztokem vzorku. Za předpokladu že intenzita toku záření vstupujícího do kyvety se nemění, hodnota na měřicím zařízení odpovídá hodnotě propustnosti měřené látky. Měření absorbance na jednopaprskových přístrojích je zatíženo chybou způsobenou nestabilitou toku záření. Zdroj záření musí být stabilní a dostatečně intenzivní. Malá intenzita zdroje záření znamená větší ovlivnění měřeného signálu šumem a kompenzuje se otevřením štěrbin. To u méně kvalitních přístrojů vede ke zhoršení kvality monochromatického záření. U moderních přístrojů je stabilní intenzita zdroje zajištěna automatickou regulací štěrbin během měření. Proto je výhodnější využívat dvoupaprskového fotometru jehož měřicí systém má výhodu v tom, že eliminuje vliv kolísání záření primárního zdroje. Měří se poměr toků ϕ/ϕ' , prakticky ve stejném okamžiku. Používají se dva monochromatické paprsky o stejném toku ϕ' z nichž jeden prochází kyvetou s referenčním roztokem (srovnávací paprsek), druhý prochází kyvetou se vzorkem (měrný paprsek).

Blokové schéma jednopaprskového spektrofotometru pro UV / VIS oblast



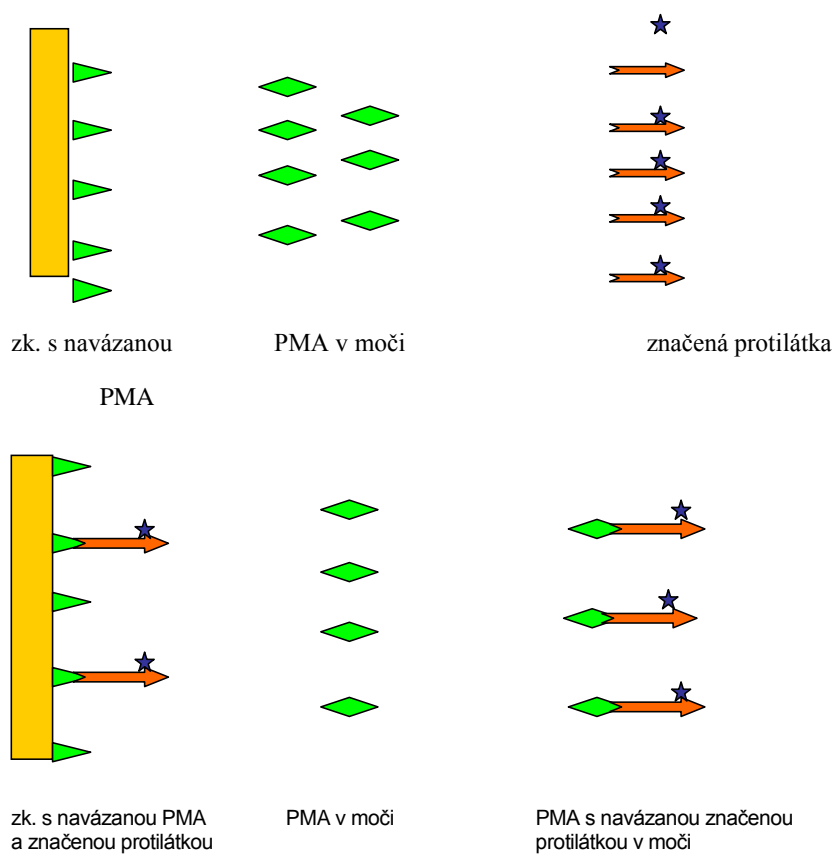
4.2. Analýza kyseliny S-fenylmerkapturové (PMA) v moči

V rámci provedených studií bylo zjištěno, že existuje souvislost mezi mírou expozice benzenu a množstvím PMA vylučované močí. Dříve se stanovení PMA provádělo pomocí GC/MS nebo HPLC. Obě tyto metody jsou však drahé a náročné na čas. Společnost MLT(17) ve spolupráci s velkou petrochemickou společností, vyvinula novou imunochemickou analýzu, založenou na vlastní patentové chemiluminiscenční technologii, sloužící k měření PMA v moči jakožto prostředku monitorování profesní expozice benzenu v reálném čase. Tento objev představuje průlomový posun v oblasti biologického monitorování.

4.2.1. Princip analýzy PMA

Kvantitativní imunochemická metoda na principu kompetice využívající k detekci S- fenylmerkapturové kyseliny chemiluminiscence kovalentně vázané značky k molekule protilátky. Na stěnách plastové zkumavky, do

které je přenesena naředěná moč, je navázána S-PMA, která na sebe váže
 protilátku značenou substituovaným acridinium esterem při kompetici
 s volnými molekulami S-PMA ze vzorku moče. Pro stanovení S-PMA
 v moči se využívá inverzní závislosti značené protilátky navázané na
 stěny zkumavky a množství S-PMA v moči



Oxidací esteru alkalickým roztokem peroxidem vodíku v detergentu je emitováno záření o vlnové délce 429 nm, které je snímáno luminometrem.

Parametry metody (rozsah, citlivost, selektivita a přesnost)

1. Koncentrační rozsah metody je od 1,5 – 200 nmol/l moči. Vzorek překračující tuto koncentraci je nutno ředit.
2. Citlivost je udána jako 1,5 nmol/l, což odpovídá 229 ng/g kreatininu.
3. Selektivita je udána výrobcem jako zkřížená reaktivita protilátky s kyselinou hippurovou (<0,001 %) a benzylmerkapturovou (< 0,4%).
4. Relativní směrodatná odchylka (VK) v krátkém časovém úseku (opakovatelnost stanovení prováděných během 1 dne) se pohybuje kolem 5%.
5. Relativní směrodatná odchylka stanovení v časovém úseku 15 dní se pohybuje kolem 20%.

Podle údajů Vyhl. MZ ze dne 15.února 2001 Sb. Zákona by u pracovníků exponovaných benzenu neměla hladina S-PMA v moči překročit limitní hodnotu 50 ug/g kreatininu, tedy 0,024 umol/mmol kreatininu.

Závěr.

Tato imunochemická metoda stanovení S-PMA je dostatečně citlivá a přesná pro tyto účely, navíc není náročná na předúpravu vzorku. Ve srovnání s metodami instrumentální analýzy je výrazně levnější, podstatně méně časově náročná a pro použití jako biologického expozičního testu při expozici benzenu vhodná.

4.2.3. Odběr vzorku

Provádí se vždy podle vyhlášky MZ na konci směny do skleněných nebo polyetylenových nádob s přiměřeně širokým hrdlem. Musí se zabránit kontaminaci exogenními nečistotami. Do 1 hodiny po odběru se přenes 5 ml moče do zkumavky s 50 ul kyseliny chlorovodíkové.

($c = 7,5 \text{ mol/l}$). Takto upravená moč je stabilní po dobu 6 měsíců.

Poznámka.

Pro hodnocení je vhodná pouze moč s koncentrací kreatininu v rozmezí od 0,3 do 3,0 g/l

(tj. od 2,65 do 26,6 mmol/l)

4.1.6 Postup imunochemické analýzy

MLT Analýza PMA v moči.

Před zahájením práce zkontroluj luminometr, zda je připraven k měření.

(Dostatek detekčních činidel, naplněné hadičky apod.)

Postup imunochemické analýzy.

1. Před zahájením přeneste všechny součásti testu do místnosti s teplotou $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
2. Předem spočítejte počet potřebných zkumavek. Pozn. V rámci každé analýzy se spotřebuje 5 standardů. Standardy a vzorky se měří duplicitně. (příklad: pokud má být analyzováno 10 vzorků moči, pak celkový počet zkumavek bude $10 + 20 = 30$).
3. Zkumavky ve stojánku řádně označte.
4. Standardy a vzorky se před analýzou musí ředit.
 - a. Do stojánku vložte potřebný počet zkumavek pro ředění vzorku.

- b. Do každé zkumavky napipetujte 1000 ul ředícího činidla (růžového)
 - c. Přidáme 200 ul příslušného standardu – vzorku v pořadí: standardy 1 – 5, vzorky moči
 - d. Všechny zkumavky dobře promíchat, aby nedošlo ke zpěnění.
5. Nyní pipetovat 200 ul ředěného vzorku duplicitně do testovacích zkumavek. Je nezbytné, aby bylo u každého kroku přesně dodrženo pořadí:
- a. Zkumavky 1 a 2 standard 1
 - b. Zkumavky 3 a 4 standard 2
 - c. Zkumavky 5 a 6 standard 3
 - d. Zkumavky 7 a 8 standard 4
 - e. Zkumavky 9 a 10 standard 5
 - f. Zkumavky 11 a 12 vzorek moči 1
 - g. Zkumavky 13 a 14 vzorek moči 2, atd.
 - h. Pokud by nebylo toto pořadí přesně dodrženo, bude výsledkem selhání celé analýzy, protože software luminometru založený na průběžném zpracování naměřených hodnot, nebude schopen analýzu provést.
6. Do každé testovací zkumavky pipetujte 200ul činidla LAC (žlutá barva).
7. Každou zkumavku promíchejte tak, aby nedošlo ke zpěnění.
8. Připravené vzorky nechejte inkubovat ve vodní lázni při teplotě 22°C po dobu 60 minut – (+ - 2,5 min)
9. Zatím co probíhá inkubace připravte promývací roztok zředěním 25 ml koncentrátu do objemu 250 ml přidáním dest. vody. Roztok označit „ Pracovní promývací roztok PMA“ s uvedením data přípravy a šarže.
10. Po skončení inkubace vylijte obsah testovacích zkumavek do odpadu a nechte odkapat na savý papír. Pipetujte do každé zkumavky 1 ml pracovního promývacího roztoku. Roztok nechejte ve zkumavce po dobu 2 +/- 0,25 min. **Dodržení časového limitu je důležité.** Opět vylijte obsah testovacích zkumavek do odpadu a nechejte odkapat. Přidejte další dávku 1 ml

11. pracovního promývacího roztoku a opakujte výše uvedený postup. (Obsah testovacích zkumavek vylitý do odpadu spláchněte tekoucí vodou).

12. Testovací zkumavky přeneste do luminometru a proveďte měření luminiscence. Před prováděním měření zkontrolujte, zda je vnější povrch zkumavek suchý.

Přístrojové vybavení – luminometr MLT

4.2.4. Výpočet koncentrace kys. fenymerkapturové a uvádění výsledků

Analýza obsahu kyseliny S-fenymerkapturové v moči (PMA) slouží ke stanovení koncentrace PMA ve vzorcích moči v jednotkách nanomoly na litr (nmol/l). Aby však výsledky analýzy byly správně interpretovány musí být přepočteny ve vztahu k celkové koncentraci samotného vzorku moči. Prvním krokem je stanovení koncentrace kreatininu v moči běžně dostupnou metodou (v našem případě metoda Jaffe), po té výpočet koncentrace PMA ve vztahu ke koncentraci kreatininu.

Výsledek koncentrace PMA je tedy v nmol/l. (nanomol/l)

Výsledek koncentrace kreatininu je v mmol/l. (milimol/l)

Tedy konc PMA / konc. kreatininu = nmol PMA na mmol kreatininu.

Příklad: Vyšetřením kreatininu v moči jsme obdrželi koncentraci 15,9 mmol/l.

Vyšetřením PMA v moči jsme získali koncentraci 95,0 nmol/l.

$$\boxed{95,0 / 15,9 = 5,97 \text{ nmol PMA/ mmol kreatininu}}$$

V této formě jsme se dohodli uvádět výsledky, protože hodnoty vyjádřené v celých jednotkách jsou výhodnější jak pro interpretaci, tak i zpracování.

Příloha č. 2 k vyhlášce č. 89/2001 Sb však uvádí jako limitní hodnotu ukazatele biologického expozičního testu v moči při expozici benzenu koncentraci 0,024 mikromol PMA/mmol kreatininu, lze v případě přepočtu výsledek námi uvedený v nmol/mmol kreatininu vydělit hodnotou 1000. Tedy $5,97 / 1000 = 0,0059$ $\mu\text{mol/mmol}$ kreatininu.

Limitní hodnoty koncentrace PMA jsou tedy **do 24 nmol/mmol kreatininu,**
nebo vyjádřeno v mikromolech **do 0,024 $\mu\text{mol/mmol}$**
kreatininu.

5. Stanovení aminolevulové kyseliny (δ ALA)

Stanovení aminolevulové kyseliny (δ ALA) se využívá k monitorování pracovníků u kterých se vyskytuje jako škodlivina v pracovním prostředí olovo.

5.1. Princip stanovení δ -ALA v moči(18)

Princip:

Kyselina δ -aminolevulová kondensuje s acetylacetonem Knorrovou reakcí na substituovaný pyrrol, který poskytuje s Ehrlichovým činidlem červenofialové zbarvení s maximem absorpce při 533 nm .

Reagencie:

1. Octanový pufr pH 4,6. 136 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v odměrné baňce na 1000 ml v 500 ml dest. vody, přidá se 57 ml ledové kys. octové a doplní dest. vodou po značku.
2. Roztok acetylacetonu: 4 ml se doplní do 100 ml octanovým pufrem.
3. Ehrlichovo – Mauzeralovo- Granickovo činidlo. 2 g p-dimethylaminobenzaldehydu se rozp. v 60 ml ledové kys. octové, opatrně se přidá 16 ml 70% kys. chloristé a doplní do 100 ml ledovou kys. octovou.
4. Základní roztok kys. δ -aminolevulové: 127,8 mg hydrochloridu kys. δ -aminolevulové se rozpustí v 50 ml odměrné baňce v dest. vodě. V 1 ml roztoku jsou 2 mg kys. δ -aminolevulové. Standardní roztok o konc. 20mg/l se připraví odpipetováním 1 ml zákl. roztoku do odm. baňky na 100 ml a doplněním po značku octanovým pufrem. Uchovávat v temnu v lednici.

Postup:

	Slepá zk.	Standarda	Vzorek
Moč	—	—	0,1 ml
Dest.voda	0,1 ml	—	—
Stand. roztok	—	0,1 ml	—
Acetylaceton	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

10 min do vroucí vodní lázně

Ochladit v tekoucí vodě

Ehrlich.č.	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
------------	--------	--------	--------

Změřit v 1 cm kyvetě proti slepé zkoušce.

Přístrojové vybavení – spektrofotometr SPEKOL

Výpočet: $\frac{A \text{ vzorku}}{A \text{ stand.}} \cdot 20 = \text{mg/l kys. } \delta\text{-aminolevulové}$

Kalibrační křivka . Do 100 ml odměrných baněk se napipetuje 0,25, 0,50, 1,0, 2,0, a 3,0 ml zákl. roztoku kyseliny δ -aminolevulové a doplní se do 100 ml směsnou močí neexponovaných osob. Vzorky obsahují vedle asi 3,0 mg kys. δ -aminolevulové, která je fyziol. součástí moče 5,10, 20, 40 a 60 mg/l; k těmto koncentracím je třeba přičíst norm. hladinu, kterou stanovíme jinou metodou, nebo zmíněnou hodnotu. Změříme po následném zpracování dle uvedeného schématu a sestrojíme kalibrační křivku.

Odběr vzorků moči. Doba odběru není příliš kritická. Okyselená moč v lednici se může uchovávat měsíc.

K 10 ml moči se přidá 0,1 ml ledové kys. octové.

Hodnocení:

Referenční hodnoty – do 50 $\mu\text{mol/l}$

Biologický limit - do 150 $\mu\text{mol/l}$

5.2. Chromatograficko kolorimetrické stanovení δ – aminolevulové kyseliny (δ -ALA) a porfobilinogenu (PBG) v moči.

Princip (19).

Vzorek moči projde dvěma iontoměničovými kolonami. PBG a ostatní interferující látky jsou adsorbovány anexem první kolony. δ ALA je adsorbována katexem druhé kolony a z této je eluována a kvantitativně stanovena Ehrlichovou reakcí. PBG může být selektivně eluován z první kolony a selektivně stanoven také Ehrlich. r. Metoda vhodná pro posouzení expozice olovem.

Reagencie:

- A. Octan sodný 1 mol/l
 - B. Acetylaceton
 - C. para dimethyl amino benzaldehyd
 - D. δ -ALA standard 0,2 mg/ml
 - E. Kys. octová 1 mol/l
 - F. Kys. octová 0,2 mol/l
- Chrom. kolony pro PBG (červené víčko)
Chrom. kolony pro δ -ALA (žluté víčko)
- Ostatní reagencie – Kys. chloristá p.a.
Kys. octová ledová

Roztoky: C- Přidej 150 ml kys. octové ledové do lahvičky C. Promíchat, uschovávat při 4st.C –stabilní 6 měsíců.

Chromogen – Přidej 1,9 ml 70% kys. chloristé do 10 ml roztoku C. Tento r. je stabilní 6 hod a vystačí pro 5 testů. Uschovávat při 4.st.C.

Příprava vzorku: Sbírat moč po 24 hod. Přidat 3-4 ml. konc. HCl. Promíchat a změřit celkový objem. Uchovávat při 4.st. C. ALA je stabilní 1 měsíc. PBG 24 hod.

Provedení testu - vlnová délka 553 nm(520-570)

vroucí vodní lázeň.

Umísti kolonu PBG nad kolonu ALA. Do horní kolony pipetuj:

Vzorek moče	1.0 ml •
Dest. voda	20.0 ml •

• eluát odstranit

Stanovení delta ALA

Pipetuj do delta ALA kolony

Reagent A	10 ml
-----------	-------

eluát zachytit

Dále pipetovat do zkumavek

	Vzorek	Standard	Slepá
	Eluát	-	
Reagent D	-	0,1 ml	-
Reagent A	-	9,9 ml	10,0 ml
Reagent B	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Dobře promíchej a vlož zkumavky na 10 min do vroucí vodní lázně.

Ochladit pod tekoucí vodou a pipetuj:

	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Chromogen	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Dobře promíchat a po 15 min stání změřit A proti slepé při 553nm.

Výpočet:

Abs. Vzorku . 2 = mg δ -ALA / dl

Abs. Standardu

$$\frac{\text{mg } \delta \text{ ALA/dl} \cdot \text{moč/24 hod v litrech}}{0,1} =$$

$$= \text{mg } \delta\text{-ALA/24 hod}$$

5.2.1. Stanovení PBG

Pipetuj do PBG kolony:

Reagent E	2,0 ml	<input type="checkbox"/>
Reagent F	2,0 ml	<input type="checkbox"/>

eluát zachytit

Dobře promíchej a pipetuj:

	Vzorek
Slepá	
Eluát	1,0 ml
-	
Dest. voda	-
1,0 ml	
Chromogen	1,0 ml
1,0 ml	

Dobře promíchat, po 15 min odečíst Absorbanci při 553 nm proti slepé zk.

Výpočet:

A vzorku . 2,92 = mg PBG/ dl moče

$$\frac{\text{mgPBG/dl moče} \cdot \text{moč/24 hod v litrech}}{0,1} =$$

$$= \text{mg PBG/24 hod.}$$

Referenční hodnoty: δ -ALA – 1.3 – 7.0 mg/24hod
tj. do 50 umol/l . Biolog. limit do 150 umol/l- (18,75mg/l)
PBG - 0 – 2,0 mg/24 hod tj. 0 – 8,85 umol/d

δ ALA mg/dl

Stupeň intoxikace org. Pb**0,00 – 0,54 = norm****žádné****0,55 – 0,99 = stopa****velmi nízké****1,00 – 1,49 = +****nízké****1,50 – 1,99 = ++****střední****2,00 – 2,99 = +++****vysoké****3,00 – 5,99 = ++++****velmi vysoké****6,00 – 10,0 = +++++****kritické**Kalibrační křivka:

	1	2	3	4	5	6	7
Reagent A ml	9,99	9,95	9,90	9,80	9,70	9,50	10,00
Reagent D ml	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,50	0,20
Reagent B ml	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

Dobře promíchej a vlož do vroucí vodní lázně na 10 min. Ochladit a dále pipetovat z každého roztoku

Chromogen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Nechat stát po dobu 15 min, potom odečíst A proti roztoku ve zkumavce č. 7.

δ – ALA mg/dl	0,2	1,0	2,0	4,0	6,0	10,0	---
---------------	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----

Zbarvení je stabilní asi 15 min

Poznámka:

M.h. δ ALA = 131,0

mg δ -ALA/24 hod . 7,626 = umol δ -ALA/d

mg PBG/24 hod . 4,42 = umol PBG/d

Set: Sibar diagnostici – Perugia Italy. K.č. 2500

6. ZÁVĚR

Cílem této studie bylo poukázat na možnosti stanovení některých postupů při stanovení biologických expozičních testů (stanovení PMA, fenolu, δ ALA), které monitorují pracovní prostředí.

7. Použitá literatura

1. Metodický návod hlavního hygienika ČSR Č.J. HEM-340.2-2.10.86 k provádění hygienického dozoru na pracovištích
2. Směrnice č. 49/1967 Věst MZ ve znění směrnice č. 17/1970 Věst MZ ČSR, posuzování zdravotní způsobilosti k práci
3. AHEM, příloha č. 4/1985
4. P. Hrnčiar: Organická Chémia, 3. vyd., SPN Bratislava 1990, str. 238
T. W. G. Solomons: Organic Chemistry, 5th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992, str. 514-515
J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers: Organic Chemistry, Oxford University Press, New York 2001, str. 151
5. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers: Organic Chemistry, Oxford University Press, New York 2001, str. 174-175
6. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Health Criteria 150: Benzene, 1993 World Health Organization, Geneva
7. Provozník K. et al., Manuál prevence v lékařské praxi, souborné vydání I.-V.díl, 1998 Fortuna Praha: 558-573
8. Souček P., Interakce benzenu a jeho derivátů s cytochromem P450 – autoreferát disertační práce, 1995 SZÚ Praha
9. Snyder R., Hedli Ch.C., An Overview of Benzene Metabolism, Env Health Persp, vol 104, suppl. 6, 1996: 1165-1170
10. Witz G., Zhang, Zh., Goldstein, B.D., Reactive ring-opened aldehyde metabolites in benzene hematotoxicity, Env Health Persp, vol 104, suppl. 6, 1996: 1195-1199
11. Meditext® - Medical management: Benzene, Clinical effects
12. BezaBeth, Sh. et al., Does benzene cause multiple myeloma? An analysis of published case-control literature, Env Health Persp, vol 104, suppl. 6, 1996: 1393-1397
13. Ross D. et al., Cell-specific metabolism of benzene in bone marrow, Env Health Persp, vol 104, suppl. 6, 1996: 1177-1182
14. Yamaguchi, Y., Hayashi, C., Clin. Chem. 23/11, 2151 – 2154 /1977/

15. Doležalová a kolektiv – Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii 1995, str. 41
16. Doležalová a kolektiv – Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii 1995, str. 42
17. www.mltresearch.com
18. Bardoděj Z., David A., Ex. testy v průmyslové toxikol., Praha Avicenum 1980, str. 228-230
19. Davis, J.R. and Andelman , S.L., Arch. Environ. Health, 15:53-59 (1967)