

## VALIDÁCIA STANOVENIA KYSELINY *TRANS,TRANS*-MUKONOVEJ AKO BIOMARKERA EXPOZÍCIE BENZÉNU METÓDOU HPLC

IVICA BAJUSOVÁ<sup>a</sup>, ĽUBOMÍR LEGÁTH<sup>b</sup>,  
TAŤÁNA GONDOVÁ<sup>c</sup> a ZUZANA VARGOVÁ<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Klinika pracovného lekárstva a klinickej toxikológie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura Košice, Rastislavova 43, 040 01 Košice, <sup>b</sup>Klinika pracovného lekárstva a klinickej toxikológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika Košice, Rastislavova 43, 040 01 Košice, <sup>c</sup>Katedra analytickej chémie, <sup>d</sup>Katedra anorganickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P. J. Šafárika Košice, Moyzesova 11, 040 01 Košice

ivica.bajusova@unlp.sk, lubomir.legath@upjs.sk, tana.gondova@upjs.sk, zuzana.vargova@upjs.sk

Došlo 25.1.11, prepracované 10.3.11, prijaté 28.4.11.

Kľúčové slová: biomarker, benzén, kyselina *trans,trans*-mukonová, HPLC, moč

### Úvod

Výskyt ochorení spôsobených priamym vplyvom chemických látok v pracovnom prostredí sa zvyšuje. Pre potreby klinickej praxe pracovného lekárstva sú preto nevyhnutné cieľené a spoľahlivé toxikologické analýzy. Zadávať sa nové, citlivé a špecifické analytické metódy, ktoré umožňujú tieto látky identifikovať, pravidelne monitorovať, a tak realizovať prevenciu profesionálnych poškodení zdravia. Laboratórne vyšetrenia a biologické expozičné testy (BET) umožňujú dokázať a stanoviť chemické látky (ich metabolity alebo konjugáty) v biologickej matici ako odraz toxickej záťaže pracovného prostredia na ľudský organizmus.

Benzén sa v priemysle používa ako rozpúšťadlo v uzavretých technologických procesoch. Podľa Medzinárodnej agentúry pre výskum rakoviny (IARC) je benzén karcinogénom skupiny 1 (látkou s dostatočne dokázanou karcinogenitou pre človeka) a mutagénom kategórie 2 (pravdepodobný mutagén). Z toxikologického hľadiska je závažný najmä pre účinky na kostnú dreň (leukémia, aplastická anémia)<sup>1–3</sup>.

V pracovnom prostredí sú zdrojom benzénu napr. toxické emisie, vznikajúce v priebehu technologických procesov pri ťažbe a spracovaní neželezných rúd, uhlia a dreva<sup>4</sup>. Od roku 1980 viaceré štáty legislatívne zaviedli nižšie expozičné limity benzénu v pracovnom ovzduší, 1–10 ppm/8 hod. V niektorých krajinách sú expozičné limity omnoho nižšie, napr. vo Švédsku 0,5 ppm alebo

v USA 0,3 ppm (cit.<sup>5</sup>). V Slovenskej republike je expozičia benzénu minimalizovaná hygienickými predpismi. *Nariadenie vlády SR 356/2006 o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozičiou karcinogénnym a mutagénnym faktorom pri práci*<sup>6</sup> uvádza technické smerné hodnoty (TSH) plynov, pár a aerosólov s karcinogénnymi a mutagénnymi účinkami v pracovnom ovzduší. Pre benzén je hodnota TSH 3,3 mg m<sup>-3</sup>, ktoré zodpovedajú expozičné ekvivalenty príslušných močom vylučovaných biomarkerov. Pre kyselinu *trans,trans*-mukonovú (*ttMA*) 2,0 mg l<sup>-1</sup> *ttMA*, resp. 1,25 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu *ttMA* v moči a pre kyselinu *S*-fenymerkaptúrovú (SPMA) 0,072 mg l<sup>-1</sup> SPMA resp. 0,045 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu SPMA v moči<sup>6</sup>. Podľa Americkej rady vládných hygienikov pre priemysel (ACGIH, 2001) je doporučená biologická medzná hodnota pre SPMA 0,025 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu, pre *ttMA* 0,5 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu, pre vzorky odobraté zamestnancom na konci pracovnej zmeny<sup>7</sup>.

Diagnostika intoxikácií benzénom vychádza z pracovnej anamnézy, klinického obrazu ochorenia a monitorovania jeho metabolitov prítomných v moči, t.j. fenolu, kyseliny *S*-fenymerkaptúrovej a kyseliny *trans,trans*-mukonovej, ktoré sú považované za vhodné biomarkery pre vyhodnotenie inhalačnej expozičie benzénu<sup>2,5,7–22</sup>.

Na rutinné monitorovanie expozičie benzénu s obsahom cca 5 ppm v ovzduší sa v minulosti najčastejšie využívalo najmä spektrofotometrické<sup>20</sup> a chromatografické (GC-FID)<sup>21</sup> stanovenie fenolu v moči (biologická medzná hodnota fenolu v moči do 30 mg l<sup>-1</sup> alebo do 19 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu je len odporúčaná<sup>18</sup>). Na stanovenie fenolu v moči bola použitá aj metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s fluorescenčnou detekciou po derivatizácii vzorky<sup>22</sup>. Fenol nie je celkom vhodný na posúdenie pracovnej expozičie, pretože ako proteínový katabolit je bežne prítomný v moči aj u neexponovanej populácie. Vyšetrenie skupinového fenolového testu pracovníkov exponovaných benzénu sa vyznačuje veľkým interindividuálnym rozptylom<sup>18</sup>.

Minoritný metabolit benzénu, kyselina *S*-fenymerkaptúrová, sa vylučuje močom ako 0,11 % podiel vstrebanej dávky benzénu. SPMA predstavuje najspoľahlivejší biomarker expozičie benzénu<sup>5</sup>. Vypracovaných bolo viaceré chromatografických metód na stanovenie SPMA v moči, napr. metóda plynovej chromatografie s MS detekciou<sup>5</sup>, HPLC metóda s UV detekciou pre simultánne stanovenie SPMA a *ttMA* v moči<sup>15</sup>. Fyziologické hladiny SPMA v moči sú u nefajčiarov 0,002 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu, u fajčiarov 0,004 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu<sup>18</sup>.

Kyselina *ttMA* nie je považovaná za špecifický biomarker expozičie benzénu, pretože je prítomná v moči aj ako metabolit kyseliny sorbovej, ktorá sa ako konzervačný prípravok pridáva do potravín, kozmetiky a farmaceutických produktov<sup>5,7,9,16</sup>. Napriek tomu stanovenie *ttMA* metódou HPLC zostáva najrozšírenejším testom expozičie benzénu pre jednoduchosť prípravy biologického materiálu a použitej analytickej metódy.

Kyselina *trans,trans*-mukonová vzniká ako metabolit pri oxidačnej biotransformácii benzénu, a pretože nie je fyziologickou zložkou moču, je jej stanovenie diagnosticky špecifickejšie v porovnaní s fenolom. *ttMA* sa vylučuje močom ako 2–4 % podiel vstrebanej dávky benzénu<sup>5,18</sup>. Počas rozpadu vylučovania *ttMA* je 5,7 h. Maximálne vylučovanie *ttMA* sa u exponovaných pracovníkov dosahuje na konci pracovnej zmeny, pričom *ttMA* predstavuje spoľahlivý indikátor expozície benzénu. Fyziologické hladiny *ttMA* v moči sú u nefajčiarov 0,04–0,14 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu, u fajčiarov 0,06–0,23 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu<sup>18</sup>, napr. pri určení referenčných hodnôt pre *ttMA* neexponovanej populácie multicentrickou štúdiou (Taliansko, 2008) sa dospelo k stanoveniu strednej hodnoty *ttMA* 0,053 mg l<sup>-1</sup> (*ttMA* 0,045 mg l<sup>-1</sup> pre nefajčiarov a 0,076 mg l<sup>-1</sup> pre fajčiarov)<sup>7</sup>.

Na stanovenie *ttMA* v moči sa využívajú najmä chromatografické metódy. K najčastejšie používaným patrí metóda HPLC na reverzných fázach s izokratickou<sup>5,7–13</sup>, prípadne gradientovou elúciou<sup>14,15,19</sup> s UV detekciou. Na detekciu sa okrem UV detektora používa aj detektor s diódovým poľom (DAD) a hmotnostný spektrometer (MS)<sup>17</sup>. Na stanovenie *ttMA* v moči bola použitá aj metóda plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (FID)<sup>16</sup>.

*ttMA* je v moči prítomná s rôznymi primárnymi a sekundárnymi metabolitmi, preto sa na jej izoláciu a prekoncentráciu najčastejšie používa extrakcia tuhou fázou (SPE). Metóda SPE extrakcie je v porovnaní s klasickou LLE, pri ktorej sa ako extrahovadlo používa octan etylatý<sup>9,13,15</sup> alebo diizopropyléter<sup>19</sup>, ekonomickejšia a súčasne ekologická pre nízku spotrebu organických rozpúšťadiel.

V článku je popísané zavedenie jednoduchšej metódy na stanovenie kyseliny *trans,trans*-mukonovej v moči ako biomarkera expozície benzénu technikou HPLC, ktorá umožňuje nahradiť klasické spektrofotometrické stanovenie fenolu. Súčasne sa uskutočnila validácia tejto už publikovanej a modifikovanej metódy<sup>5</sup>, ktorá bola overená stanovením *ttMA* v reálnych biologických vzorkách toxikologického laboratória.

## Experimentálna časť

### Chemikálie

Kyselina *trans,trans*-mukonová (98%) sa získala od firmy Sigma-Aldrich (USA). Použité rozpúšťadlá boli kvality HPLC gradient, metanol (99,9%, Merck, Nemecko), ľadová kyselina octová (99,8%, Fluka, Nemecko). Deionizovaná voda bola pripravená na zariadení Aqual 35 (Merci Slovakia, Slovensko). Certifikovaný referenčný materiál (CRM, Clin Check Control) lyofilizovaný moč s obsahom *ttMA* v dvoch koncentračných hladinách 1,7 mg l<sup>-1</sup> (1,3–2,1 mg l<sup>-1</sup>) a 8,7 mg l<sup>-1</sup> *ttMA* (6,8–11,0 mg l<sup>-1</sup>) bol získaný od firmy Recipe (Nemecko).

### Prístroje a zariadenia

Na separáciu a stanovenie *ttMA* v moči bol použitý kvapalinový chromatograf Shimadzu LC 20 Prominence (Japonsko) s čerpadlom LC-20AD, odplyňovačom DGU-20A5, autosamplerom SIL-20AC, termostatom kolóny CTO-20AC a PDA detektorom SPD M20A. Na separáciu pri 20 °C bola použitá kolóna Nucleosil C-18, 12,5 cm × 4,0 mm; 5 μm (Watrex, Česká republika). Ako mobilná fáza bola použitá zmes 0,8% (v/v) kyselina octová : metanol (89:11, v/v) s prietokom 1 ml min<sup>-1</sup>. UV detekcia sa uskutočnila pri vlnovej dĺžke 263 nm.

Dávkovaný objem vzorky bol 10 μl. Na vyhodnotenie analýz bol použitý softvér LC Solution (Shimadzu, Japonsko).

Extrakcia tuhou fázou sa uskutočnila na dvanásťpolohovom vákuovom extraktore Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, USA) s použitím SPE kolóniek s anexam LC-SAX 0,5 g / 3 ml (Supelco, USA).

### Príprava štandardných roztokov

Zásobný roztok *ttMA* s koncentráciou 1 mg ml<sup>-1</sup> bol pripravený rozpustením 100 mg *ttMA* v 100 ml metanolu za pomoci ultrazvuku. Pracovný roztok *ttMA* s koncentráciou 0,1 mg ml<sup>-1</sup> bol pripravený zmiešaním 10 ml zásobného roztoku *ttMA* s 0,8% kyselinou octovou v 100ml odmernej banke. Uvedený pracovný roztok štandardu bol uchovaný v chladničke, pri teplote (+2 až +8 °C). Z pracovného roztoku *ttMA* (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) boli riedením pripravené roztoky na získanie kalibračnej závislosti v rozsahu 0,1–10,0 μg ml<sup>-1</sup> *ttMA* v moči. Na riedenie bol použitý moč od zdravých darcov, neexponovaných benzénom, bez premedikovania. Kalibračná závislosť bola zostrojená použitím piatich roztokov štandardu *ttMA* v moči s koncentráciou 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0 μg ml<sup>-1</sup> *ttMA*.

### Príprava vzoriek

Reálne vzorky moču boli získané od pracovníkov exponovaných benzénom v čase, keď bola koncentrácia chemickej látky teoreticky najvyššia, t.j. na konci 8hodinovej pracovnej zmeny, koncom pracovného týždňa. Moč na stanovenie *ttMA* sa odoberal do plastových skúmaviek. pH vzorky bolo upravené (pH 7–10). Vzorky moču bolo možné uchovať v chladničke asi 5 dní do ich spracovania. Ak bol interval medzi zberom a stanovením *ttMA* vyšší ako 5 dní, vzorka biologického materiálu bola zmrazená<sup>5,8</sup>.

### Extrakcia *ttMA*

*ttMA* bola extrahovaná z 1 ml reálnej vzorky moču použitím extrakcie tuhou fázou (SPE) postupom podľa<sup>5,8</sup>. Kondicionovanie extrakčnej kolónky sa uskutočnilo premytím 3 ml metanolu a 3 ml deionizovanej vody. Na aktívovanú SPE kolónku bol aplikovaný 1 ml moču. Kolónka bola následne premytá 3 ml 1% kyseliny octovej. Na elú-

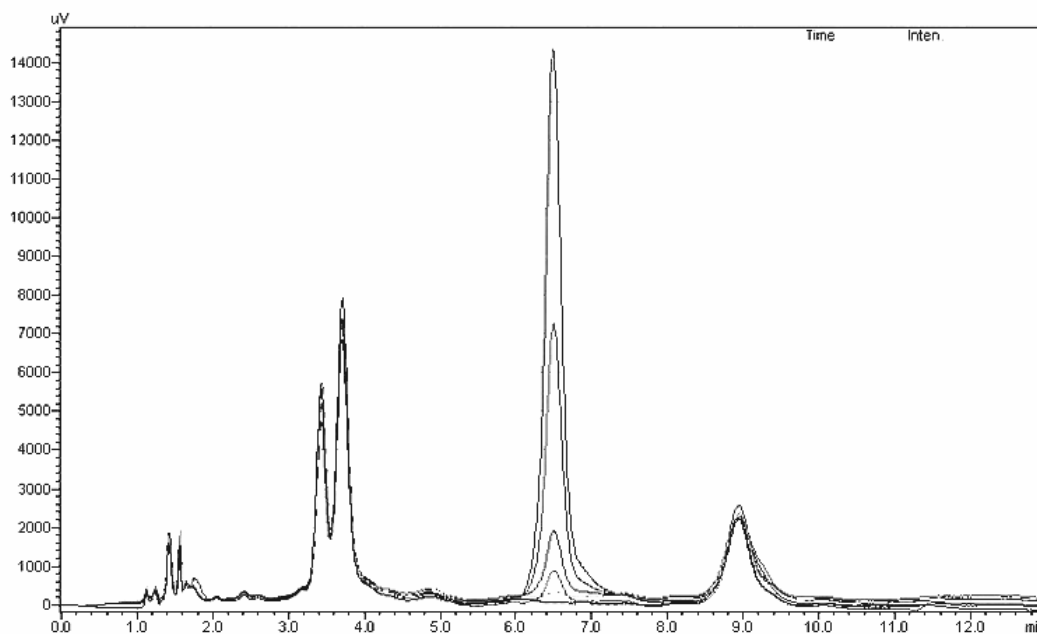
ciu zadržaného analytu bola použitá 10% kyselina octová  $2 \times 2$  ml. Eluát bol zachytávaný do skúmavky a supernatant v objeme 10  $\mu$ l bol použitý na chromatografickú analýzu.

## Výsledky a diskusia

Na obr. 1 je chromatogram HPLC analýzy moču aj s prídavkom roztokov kalibračných štandardov *tt*MA, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej závislosti (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0  $\text{mg l}^{-1}$  *tt*MA). Slepou vzorkou bol natívny moč získaný od darcu bez expozície benzénu. Na identifikáciu piku *tt*MA bol použitý retenčný čas štandardu. Retenčný čas ( $t_R$ ) *tt*MA pri daných experimentálnych podmienkach bol 6,5 min. Odozva detektora bola lineárna v rozsahu koncentrácií 0,1–10,0  $\text{mg l}^{-1}$ , čo zahŕňa požadované rozmedzie. Každý z piatich roztokov kalibračného štandardu bol dávkaný trikrát. Regresná rovnica kalibračnej závislosti pre *tt*MA v moči bola  $y = 26705,9x - 2352,99$ , kde  $y$  je plocha piku *tt*MA ( $\text{mAU} \cdot \text{min}$ ) a  $x$  je koncentrácia *tt*MA v  $\text{mg l}^{-1}$ , s korelačným koeficientom 0,9998.

Medza detekcie (LOD) a stanovenia (LOQ) bola určená zo smerodajnej odchýlky opakovaných meraní slepých vzoriek<sup>23</sup>. Hodnota medze detekcie (LOD) a stanovenia (LOQ) odpovedala trojnásobku, resp. desaťnásobku smerodajnej odchýlky signálu slepého pokusu. Hodnota LOD a LOQ pre stanovenie *tt*MA v moči bola 0,057  $\text{mg l}^{-1}$  a 0,189  $\text{mg l}^{-1}$ . Výsledky sú porovnateľné s hodnotami LOD pre *tt*MA uvedenými v literatúre<sup>9,10,13</sup>.

Presnosť metódy bola overená ako opakovateľnosť a bola vyjadrená hodnotou relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD, %) opakovaných meraní, ktoré sa uskutočnili v jeden deň. Opakovateľnosť (presnosť) bola určená z desiatich opakovaných meraní vzorky v dvoch koncentračných hladinách 1 a 10  $\text{mg l}^{-1}$ . Výsledky sú uvedené v tab. I, z ktorej vyplýva, že RSD neprekročila 7,1 %.



Obr. 1. HPLC záznamy moču a moču s prídavkom štandardu kyseliny *trans,trans*-mukonovej ( $t_R = 6,5$  min). Podmienky analýzy sú uvedené v texte. Koncentrácia *tt*MA v moči 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0  $\text{mg l}^{-1}$  *tt*MA

Tabuľka I

Opakovateľnosť ( $n=10$ ) a reprodukovateľnosť ( $n=6$ ) stanovenia *tt*MA v moči metódou HPLC

<i>tt</i> MA [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	Validačný parameter	Stanovená koncentrácia priemer $\pm$ SD [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	RSD [%]
1,0	opakovateľnosť	$0,98 \pm 0,07$	7,1
	reprodukovateľnosť	$1,05 \pm 0,08$	7,6
10,0	opakovateľnosť	$10,01 \pm 0,59$	5,9
	reprodukovateľnosť	$10,29 \pm 0,15$	1,5

Reprodukovateľnosť bola overená opakovaným stanovením jednej vzorky v dvoch koncentračných hladinách, 1 a 10 mg l<sup>-1</sup>, počas šiestich rôznych dní, pričom každé meranie sa uskutočnilo trikrát (tab. I). Odpovedajúce hodnoty RSD pri oboch koncentráciách neboli vyššie ako 7,6 %.

Správnosť metódy (výťažnosť) bola overená analýzou CRM *ttMA* pri dvoch rôznych koncentráciách (tab. II). Analýza jednotlivých CRM sa zopakovala šesťkrát. Z tabuľky je vidieť, že výťažnosť *ttMA* v oboch koncentračných hladinách bola vyššia ako 96 %.

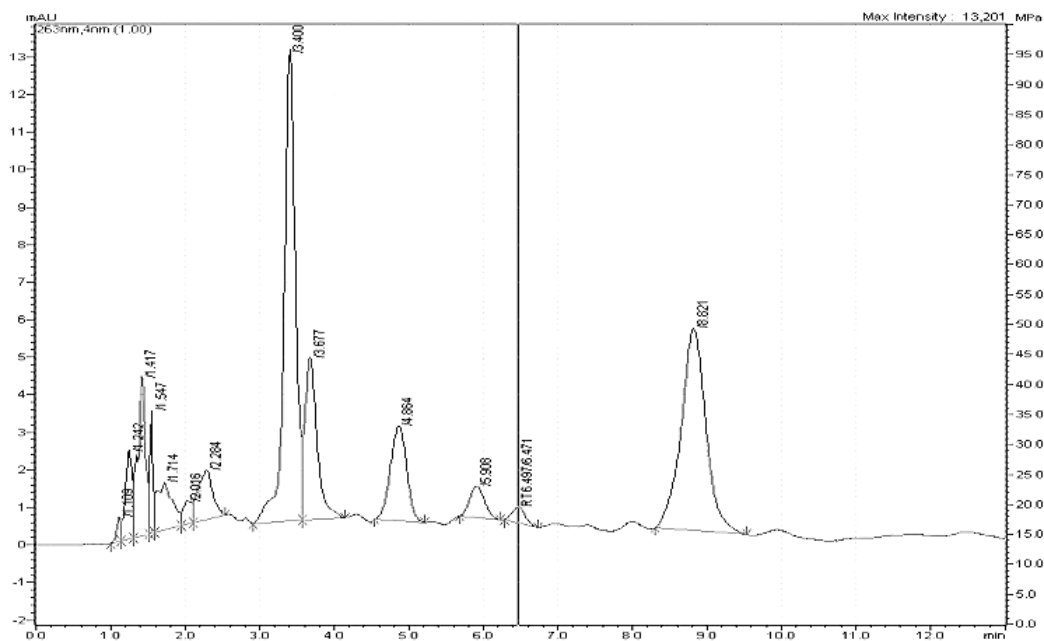
Testovanie správnosti HPLC metódy sa uskutočnilo aj na úrovni externého hodnotenia kvality, zapojením laboratória do cyklu externej kontroly akreditovaným Ústavom a Klinikou pracovného lekárstva, sociálnej a environmentálnej medicíny Univerzity Erlangen-Nuremberg (Nemecko) v programe pre vzájomné porovnanie toxikologických analýz v biologických materiáloch, č. 43/2009 pre pracovné lekárstvo a environmentálnu medicínu. Cyklus externej kontroly kvality pre parameter *ttMA* v moči bol pre naše pracovisko vyhodnotený pozitívne.

Pri analýze reálnych vzoriek moču pri 263 nm (obr. 2) nebol zaznamenaný žiadny vplyv matrice, resp. iné interferujúce alebo koelujúce analyty s *ttMA*, čo potvrdzuje špecifickosť HPLC metódy.

#### Analýza reálnych vzoriek

Na BET bol moč odoberaný exponovaným pracovníkom v čase, keď bola koncentrácia chemickej látky najvyššia, tj. na konci pracovnej zmeny, koncom pracovného týždňa. Stanovená koncentrácia *ttMA* v moči bola prepočítaná na koncentráciu súčasne vylučovaného kreatinínu. Kreatinín bol stanovený spektrofotometricky využitím *Jaffého reakcie*<sup>20</sup>. Klasická spektrofotometrická metóda bola použitá aj na stanovenie fenolu v moči. Metóda je založená na reakcii fenolu uvoľneného hydrolyzou so 4-aminoantipyrínom (v alkalickom prostredí po pridaní hexakynoželzitanu draselného) za vzniku červeno sfarbeného indofenolového farbiva<sup>20</sup>.

HPLC metóda na stanovenie *ttMA* (obr. 2) bola aplikovaná na reálne vzorky moču pracovníkov pracujúcich



Obr. 2. HPLC chromatogram moču pacienta po expozícii benzénu. Podmienky extrakcie a HPLC analýzy *ttMA* ( $t_R = 6,5$  min) sú uvedené v texte

Tabuľka II

Výťažnosť stanovenia *ttMA* v moči metódou HPLC ( $n=6$ )

<i>ttMA</i> [mg l <sup>-1</sup> ]	Koncentrácia <i>ttMA</i> priemer ± SD [mg l <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	Výťažnosť [%]
1,7	1,75 ± 0,04	2,3	103
8,7	8,38 ± 0,53	6,3	96

Tabuľka III

Stanovenie metabolitov benzénu, *tt*MA a fenolu, v moči pracovníkov bez expozície a s expozíciou benzénu

Analyt	Stanovená koncentrácia priemer ± SD [mg l <sup>-1</sup> ]	Koncentrácia priemer ± SD [mg g <sup>-1</sup> kreatinínu]
<i>Pacienti bez expozície benzénu (n=19)</i>		
<i>tt</i> MA	0,34 ± 0,50	0,29 ± 0,24
fenol	13,11 ± 18,03	12,16 ± 11,42
<i>Pracovníci s expozíciou benzénu (n=99)</i>		
<i>tt</i> MA	0,69 ± 0,99	0,64 ± 0,95
fenol	14,35 ± 11,58	11,07 ± 8,51

v prostredí kontaminovanom benzénom. Vyšetrených bolo 99 exponovaných pracovníkov v období marec–apríl 2010. Stanovený bol obsah *tt*MA a fenolu v moči, ako následok pracovnej expozície. Na skupinovom teste sa zúčastnilo 98 mužov (priemerný vek 45,4 rokov) a 1 žena (53 rokov). V tom istom období bolo vyšetrených 19 reálnych vzoriek moču pacientov kliniky, ktorí neboli pracovne exponovaní benzénom a ktorí slúžili ako porovnávací kontrolná skupina. Na kontrolnom teste sa zúčastnilo 17 mužov (priemerný vek 50,4 rokov) a 2 ženy (priemerný vek 56,5 rokov).

Hodnota priemernej koncentrácie kreatinínu vo vyšetrovanej skupine bola 1392,8 ± 589,2 mg l<sup>-1</sup> (priemer ± SD) s rozsahom nameraných hodnôt kreatinínu v intervale 160,6–3450,6 mg l<sup>-1</sup>. U kontrolnej skupiny bola priemerná koncentrácia kreatinínu 1143,8 ± 588,9 mg l<sup>-1</sup> (priemer ± SD) s rozsahom experimentálnych hodnôt kreatinínu 330,7 až 2277,3 mg l<sup>-1</sup>.

Výsledky stanovenia *tt*MA a fenolu v moči sú znázornené v tab. III. Z tabuľky vyplýva, že obsah *tt*MA v moči u skupiny pracovníkov exponovaných benzénom bol vyšší (0,64 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu) v porovnaní s kontrolnou skupinou (0,29 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu) aj napriek tomu, že fajčenie ako ďalší faktor ovplyvňujúci obsah benzénu nebol braný do úvahy. Benzén je súčasťou aj cigaretového dymu, a preto je obsah jeho metabolitov v moči, napr. *tt*MA vyšší u fajčiarov<sup>2,18</sup>. Podľa Mráza a spol.<sup>18</sup> je obsah *tt*MA u nefajčiarov 0,04–0,14 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu, kým u fajčiarov je vyšší 0,06–0,23 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu. Na spoľahlivú interpretáciu získaných výsledkov by preto bolo potrebné túto skutočnosť zohľadniť.

Obsah *tt*MA u kontrolnej skupiny neexponovaných pacientov bol dvojnásobne nižší v porovnaní s exponovanými pracovníkmi a súčasne bol porovnateľný s hodnotami uvedenými v literatúre<sup>18</sup>. Na druhej strane zvýšenie obsahu fenolu v moči vo vyšetrovanej skupine exponovaných pracovníkov v porovnaní s kontrolnou skupinou nebolo zaznamenané, obe hodnoty sú porovnateľné a nižšie ako je akceptovateľný a doporučený limit fenolu v moči (19 mg g<sup>-1</sup> kreatinínu) pre pracovníkov exponovaných benzénom<sup>18</sup>.

## Záver

Metóda HPLC s UV detekciou je vhodnou a spoľahlivou alternatívou pre rutinné stanovenie kyseliny *trans,trans*-mukonovej v moči ako biomarkera expozície karcinogénnemu benzénom. Pre rutinné použitie je dôležité, aby sa metóda vyznačovala jednoduchou a rýchlou úpravou vzorky biologického materiálu, ako aj malou spotrebou chemikálií, ktoré umožňujú izoláciu *tt*MA extrakciou tuhou fázou. Priemerný čas HPLC analýzy bol 9,5 min, čo predstavuje relatívne rýchle stanovenie metabolitu v klinickej praxi. Metóda bola po validácii úspešne použitá na stanovenie kyseliny *trans,trans*-mukonovej v reálnych biologických vzorkách. Analýzou vzoriek pracovníkov exponovaných benzénom sa potvrdilo, že HPLC stanovenie *tt*MA, ako metabolitu inhalovaného benzénu, vylučovaného močom je akceptovateľné a vhodné na rýchly a spoľahlivý biomonitoring pracovného prostredia.

## LITERATÚRA

- Buchancová J. (ed.): *Pracovné lekárstvo a toxikológia*. Vydavateľstvo Osveta spol s r.o., Martin 2003.
- Fustinoni S., Consonni D., Campo L., Buratti M., Colombi A., Pesatori A. C., Bonzini M., Bertazzi P. A., Foa V., Garte S., Farmer P. B., Levy L. S., Pala M., Valerio F., Fontana V., Desideri A., Merlo D. F.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 14, 2237 (2005).
- Weisel C. P.: *Chem.-Biol. Interact.* 184, 58 (2010).
- Cockerham L. G., Shane B. S. (ed.): *Basic Environmental Toxicology*. CRC Press, Boca Raton 1994.
- Boogaard P. J., Van Sittert N.: *Environ. Health Perspect.* 104, 1151 (1996).
- Nariadenie vlády SR 356/2006 o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozíciou karcinogénnym a mutagénnym faktorom pri práci*, Zbierka zákonov č.356/2006, čiastka 125, str. 2579.
- Aprea C., Sciarra G., Bozzi N., Pagliantini M., Perico A., Bavazzano P., Leandri A., Carrieri M., Scapellato M. L., Bettinelli M., Bartolucci G. B.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 329 (2008).
- Shahtaheri S. J., Ghamari F., Golbabaei F., Rahimi-

- Froushani A., Abdollahi M.: *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* 11, 377 (2005).
9. Bahrami A., Edwards J.: *Pak. J. Biol. Sci.* 8, 1703 (2005).
  10. Wiwanitkit V., Suwansaksri J., Soogarun S.: *Yale J. Biol. Med.* 76, 103 (2003).
  11. Fracasso M. E., Doria D., Bartolucci G. B., Carrieri M., Lovreglio P., Ballini A., Soleo L., Tranfo G., Manno M.: *Toxicol. Lett.* 192, 22 (2010).
  12. Bahrami A. R., Joneidi Jafari A., Ahmadi H., Mahjub H.: *Ind. Health* 45, 396 (2007).
  13. Hu X., Song S., Ye F., Liu L.: *Biomed. Environ. Sci.* 19, 292 (2006).
  14. Lee B. L., Ong H. Y., Ong Y. B., Ong Ch. N.: *J. Chromatogr., B* 818, 277 (2005).
  15. Tharnpoophasiam P., Kongtip P., Wongwit W., Fungladda W., Kitayaporn D.: *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 35, 717 (2004).
  16. Kongtip P., Leelapaiboon S., Yoosook W., Chantanakul S.: *J. Health Res.* 23, 117 (2009).
  17. Tranfo G., Paci E., Sisto R., Pigni D.: *J. Chromatogr., B* 867, 26 (2008).
  18. Mráz J., Stránský V., Šperlingová I., Dušková Š.: XVI. konzultační den SZÚ-CPL Praha: Možnosti biologického monitorování expozice benzenu. Centrum pracovního lékařství, Státní zdravotní ústav, Praha, 20.9.2007, [http://www1.szu.cz/chpnp/pages/education/16moznosti\\_biol\\_monit\\_benzenu.pdf](http://www1.szu.cz/chpnp/pages/education/16moznosti_biol_monit_benzenu.pdf), stiahnuté z internetu 23.1.2011.
  19. Šperlingová I., Dabrowská L., Stránský V., Tvrdíková M.: XVI. konzultační den SZÚ-CPL Praha: Biologické monitorování expozice benzenu- stanovení kyseliny mukonové v moči, Centrum pracovního lékařství, Státní zdravotní ústav, Praha, 20.9.2007 [http://www1.szu.cz/chpnp/pages/education/16mon\\_exp\\_benzenu.pdf](http://www1.szu.cz/chpnp/pages/education/16mon_exp_benzenu.pdf), stiahnuté z internetu 23.1.2011.
  20. Bardoděj Z. (ed.): *Expoziční testy v průmyslové toxicologii*. Avicenum, Praha 1980.
  21. National Institute of Occupational Safety & Health, NIOSH (USA), Manuál analytických metod 8001-9999, <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/8305.pdf>, stiahnuté z internetu 14.8.2010.
  22. Nakashima K., Kinoshita S., Wada M., Kuroda N., Baeyens W. R. G.: *Analyst* 123, 2281 (1998).
  23. Suchánek M.: *Kvalimetrie. 9. Vhodnost analytických metod pro daný účel*. Eurachem-ČR, Praha 1999.

**I. Bajusová<sup>a</sup>, I. Legáth<sup>b</sup>, T. Gondová<sup>c</sup>, and Z. Vargová<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> Department of Occupational Medicine and Clinical Toxicology, L. Pasteur University Hospital, Košice, <sup>b</sup> Department of Occupational Medicine and Clinical Toxicology of Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice, <sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>d</sup> Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, Košice, Slovakia): **Validation of HPLC Method for Determination of *trans,trans*-Muconic Acid as Bio-marker of Benzene Exposure**

Determination of phenol in urine is a widely used method. However, it may provide false positive results due to possible presence of aromatic amino acids, which can also produce phenol in urine. *Trans,trans*-muconic acid (MA) is a non-phenolic metabolite of benzene which appears in urine. The present review deals with determination of MA by RP-HPLC with UV detection. MA was isolated from urine by solid phase extraction (SPE). The mean recovery was 96–103 %. The detection and quantification limits were 0.057 mg l<sup>-1</sup> and 0.189 mg l<sup>-1</sup>, respectively. This method can be used to determine, control and monitor the level of MA in urine of workers, who are overexposed to benzene. The obtained data were compared with those of the non-exposed control group. The results suggest that MA could be one of the validated benzene bio-markers in risk assessment.