

Joanna Stragierowicz
Karolina Mikołajewska
Marta Zawadzka-Stolarz
Danuta Ligocka

OZNACZANIE BIOMARKERÓW NARAŻENIA ZAWODOWEGO I ŚRODOWISKOWEGO NA BENZEN I STYREN Z ZASTOSOWANIEM TECHNIKI LC-MS/MS

BIOMARKERS OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO BENZENE AND STYRENE DETERMINATED BY LC-MS/MS

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera / Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland
Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego / Chemical Safety Department

STRESZCZENIE

Wstęp: W wyniku przeprowadzonych badań opracowano czułą i specyficzną metodę oznaczania metabolitów benzenu i styrenu w moczu. Przedstawione postępowanie może być zastosowane do monitoringu biologicznego narażenia zawodowego i środowiskowego. **Materiał i metody:** Przygotowanie próbek moczu w celu oznaczania metabolitów styrenu (kwasu fenylogliksalowego – PGA i kwasu migdałowego – MA) wymaga jedynie zakwaszenia kwasem mrówkowym, a w przypadku metabolitu benzenu (kwasu S-fenylmercapturowego – S-PMA) dodatkowo ekstrakcji octanem etylu. Do oznaczeń wykorzystano technikę wysokosprawną chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry – HPLC-MS/MS). Jakość analiz weryfikowano, stosując wewnętrzną i zewnętrzną kontrolę jakości. **Wyniki:** Granica wykrywalności metody (limit of detection – LOD) wynosi dla: S-PMA – 0,33 µg/l, MA – 60 µg/l i dla PGA – 40 µg/l; a precyzja: 2–3% i odzysk: 94–98%. **Wnioski:** Opracowana metoda oznaczania ilościowego metabolitów benzenu i styrenu może być stosowana zarówno do monitoringu biologicznego narażenia zawodowego, jak i środowiskowego. Med. Pr. 2012;63(5):565–572

Słowa kluczowe: benzen, styren, LC-MS/MS, S-PMA, MA, PGA

ABSTRACT

Background: Based on the studies performed a sensitive and simple method for the determination of benzene and styrene metabolites in urine has been developed. The developed procedure can be used for biological monitoring of occupational and environmental exposure. **Material and Methods:** Urine samples for the determination of styrene metabolites (phenylglyoxylic acid – PGA and mandelic acid – MA) were only acidified with formic acid, while those for the determination of benzene metabolite (S-phenylmercapturic acid – S-PMA) were additionally extracted with ethyl acetate. The measurement was performed by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The quality of our analysis was verified using internal and external quality control. **Results:** Limit of detection for S-PMA was 0.33 µg/l, for MA – 60 µg/l and for PGA – 40 µg/l; precision was 2–3% and recovery 94–98%. **Conclusions:** The method for the quantification of benzene and styrene metabolites can be used for biological monitoring of occupational and environmental exposure. Med Pr 2012;63(5):565–572

Key words: benzene, styrene, LC-MS/MS, S-PMA, MA, PGA

Adres autorek: Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera,
ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: stragier@imp.lodz.pl
Nadesłano: 19 czerwca 2012, zatwierdzono: 20 sierpnia 2012

WSTĘP

Powszechnie stosowaną metodą oceny narażenia pracowników na stanowisku pracy jest monitoring środowiskowy, czyli oznaczanie stężenia substancji che-

micznych w powietrzu i odniesienie wyników do aktualnie obowiązujących najwyższych dopuszczalnych stężeń (NDS). Kiedy jednak na wielkość wchłaniania wpływają takie czynniki, jak zwiększona wentylacja płuc w wyniku obciążenia wysiłkiem, dodatkowo wchłania-

nie przez skórę lub z przewodu pokarmowego, ocenę narażenia umożliwia tylko monitoring biologiczny (1).

Zależność stężeń metabolitów benzenu i styrenu w moczu od stężeń w powietrzu związków pierwotnych zostały ustalone na podstawie danych uzyskanych w warunkach eksperymentalnych lub na stanowiskach pracy, a ich wyniki wykorzystano do ustalenia zalecanych wartości dopuszczalnych stężeń biologicznych (DSB) (1–3).

Benzen

Narażenie zawodowe na benzen występuje głównie w przemyśle petrochemicznym, chemicznym i samochodowym. Potencjalne źródło narażenia pracowników mogą stanowić także wszystkie czynności związane z transportem, magazynowaniem i przelewaniem benzyny. Zastosowanie benzenu związane jest przede wszystkim z produkcją etylobenzenu, kumenu i cykloheksanu. Dawniej w wielu gałęziach przemysłu (poligrafia, produkcja klejów, lakierów oraz farb) benzen był stosowany jako rozpuszczalnik lub dodatek (4).

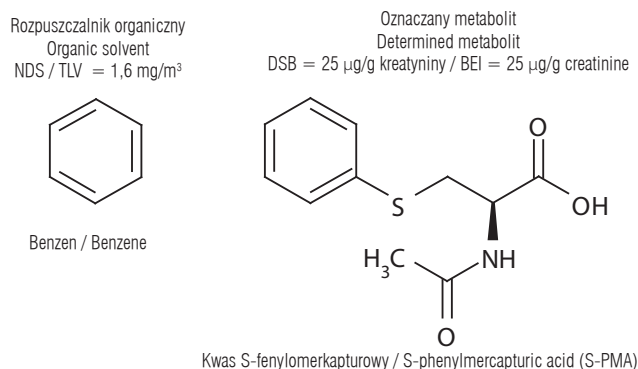
Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer – IARC) zaklasyfikowała benzen do grupy związków o udowodnionym działaniu rakotwórczym dla ludzi (grupa 1), ponieważ po narażeniu przewlekłym działa on hematotoksycznie, prowadząc do różnego typu białaczek (5). Spowodowało to znaczne ograniczenie jego stosowania. Mimo to nadal odnotowywane są przypadki przekroczenia NDS dla benzenu, np. w 2010 roku 58 osób pracowało na stanowiskach pracy, gdzie benzen występował w stężeniu powyżej NDS (6).

W ustawodawstwie polskim na przestrzeni ostatnich ok. 40 lat najwyższe dopuszczalne stężenia dla benzenu były zmieniane od 30 mg/m³ do obecnie obowiązującej wartości – 1,6 mg/m³ (7). W środowisku życia narażenie na benzen może być większe w wyniku zanieczyszczenia powietrza spalinami samochodowymi, produktów spożywczych i wody oraz biernego i czynnego palenia papierosów (8,9).

Stężenie benzenu w strefie oddechowej wynosi u osób palących i niepalących odpowiednio 20 µg/m³ i 2 µg/m³ (10). Średnie stężenia roczne benzenu w powietrzu na terenie województwa małopolskiego w 2010 roku wynosiły 2,3–4,1 µg/m³ (11). Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 3 marca 2008 r. w sprawie poziomów niektórych substancji w powietrzu dopuszczalne średnie stężenie roczne benzenu w powietrzu wynosi 5 µg/m³ (12). Wyniki badań przeprowadzonych w 2011 roku we Włoszech wykazały, że na terenie uprzemysłowionym (Bologna) maksymalne stężenie benzenu

w powietrzu wynosiło 31,41 µg/m³, co odpowiadało stężeniu kwasu S-fenylmerkapturowego (S-PMA) w moczu ludzi – 0,7 µg/g kreatyniny (13).

Weisel (9) porównał wykorzystanie do oceny narażenia na benzen metodą monitoringu biologicznego pomiaru niezmetabolizowanej formy w moczu i we krwi, adduktów DNA lub hemoglobiny oraz oznaczanie stężenia metabolitów w moczu (hydrochinonu, katecholu lub fenolu) różnymi metodami analitycznymi (chromatografii gazowej (gas chromatography – GC) sprzężonej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (flame ionization detector – FID) lub spektrometrem mas (mass spectrometer – MS) oraz chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z detektorem UV, detektorem fluorescencyjnym (fluorescence detector – FLD) lub z tandemowym spektrometrem mas (MS/MS). Pierwszym i rutynowo oznaczanym metabolitem w moczu był fenol. Po obniżeniu wartości NDS jego zastosowanie okazało się jednak nieużyteczne. Z tego powodu obecnie zaleca się pomiar stężenia kwasu S-fenylmerkapturowego (S-phenylmercapturic acid – S-PMA) i kwasu trans,trans-mukonowego (t,t-MA) w moczu (ryc. 1), które lepiej korelują z wielkością narażenia na benzen w szerokim zakresie stężeń.



NDS – najwyższe dopuszczalne stężenie / TLV – threshold limit value.

DSB – dopuszczalne stężenie biologiczne / BEI – biological exposure index.

Ryc. 1. Wartości normatywne dla benzenu (7,25)

Fig. 1. Limit values for benzene (7,25)

W przypadku zastosowania kwasu t,t-mukonowego jako pojedynczego biomarkera istnieje wiele czynników mogących wpływać na zwiększenie jego stężenia w moczu, a przez to na możliwość przeszacowania wielkości narażenia na benzen. Należą do nich palenie papierosów oraz narażenie na kwas sorbowy i jego sole, które są dodawane powszechnie jako konserwanty produktów spożywczych, leków i kosmetyków. W związku z tym kwas S-fenylmerkapturowy jest bardziej specyficznym

biomarkerem narażenia na benzen niż kwas t,t-mukonowy (9,14). Ponadto Manini i wsp. dokonali porównania pomiaru S-PMA w moczu oraz formy niezmienniczej – benzeny w moczu – i wykazali większą czułość dla oznaczania S-PMA w moczu (15). Oznaczanie S-PMA w moczu w stężeniach poniżej 1 µg/g kreatyniny wymaga jednak zastosowania wysoce czułych technik analitycznych o niskich granicach wykrywalności.

Styren

Styren jest wykorzystywany przede wszystkim w postaci polimeru – polistyrenu, który znajduje szerokie zastosowanie przy produkcji opakowań z tworzyw sztucznych, jednorazowych kubków, pojemników, izolacji termicznych w budownictwie i urządzeniach chłodniczych. Ponadto używany jest również do produkcji kauczuku butadienowo-styrenowego i innych polimerów oraz żywic, które są wykorzystywane do produkcji łodzi, kabin prysznicowych, opon, części samochodowych i wielu innych produktów. Głównym źródłem narażenia zawodowego jest produkcja wzmocnionych tworzyw sztucznych, w której stężenia styrenu w powietrzu zwykle nie przekraczają 100 mg/m³ (16).

Styren występuje również w powietrzu atmosferycznym na poziomie ppb (µg/m³), a także w wielu produktach domowego użytku (opakowania, zabawki, sprzęt sportowy, urządzenia elektroniczne) oraz w żywności zanieczyszczonej przez styren uwalniany z opakowań (16,17). Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem zaklasyfikował styren do grupy 2B, czyli związków, dla których nie ma wystarczających dowodów na działanie rakotwórcze dla ludzi, ale istnieje ograniczony dowód działania rakotwórczego u zwierząt. W wyniku przewlekłego narażenia na styren obserwuje się zmiany w układzie limfatycznym i krwiotwórczym (18).

W Polsce NDS dla styrenu w środowisku pracy wynosi 50 mg/m³ (7). Tylko w 2010 roku zostało zgłoszo-

nych 480 osób pracujących w warunkach, w których stężenie styrenu w powietrzu przekracza NDS. Większość z nich pracuje przy produkcji wyrobów z gumy i tworzyw sztucznych oraz przy produkcji pojazdów samochodowych i innego sprzętu transportowego (6). Ponadto tlenek-7,8-styrenu – metabolit styrenu – został zaklasyfikowany jako związek o udowodnionym działaniu rakotwórczym dla zwierząt i prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (grupa 2A) (19), natomiast w ustawodawstwie polskim nie określono dla niego wartości NDS ani DSB.

Monitoring biologiczny narażenia na styren jest możliwy dzięki oznaczaniu różnych biomarkerów: adduktów tlenu styrenu – metodą GC-MS; kwasów merkapturowych w moczu i styrenu we krwi – metodą GC-FID; oraz kwasu migdałowego i fenyloglioksalowego w moczu – metodami GC-FID, HPLC-UV lub HPLC-MS/MS. Kwas migdałowy (mandelic acid – MA) i fenyloglioksalowy (phenylglyoxylic acid – PGA) (ryc. 2) stanowią ponad 95% wszystkich metabolitów styrenu wydalanych z moczem i są najczęściej stosowanymi biomarkerami narażenia na styren. Istnieje dobra korelacja między stężeniem styrenu w powietrzu a sumą stężeń kwasu migdałowego i kwasu fenyloglioksalowego w moczu, korygowanych stężeniem kreatyniny (20).

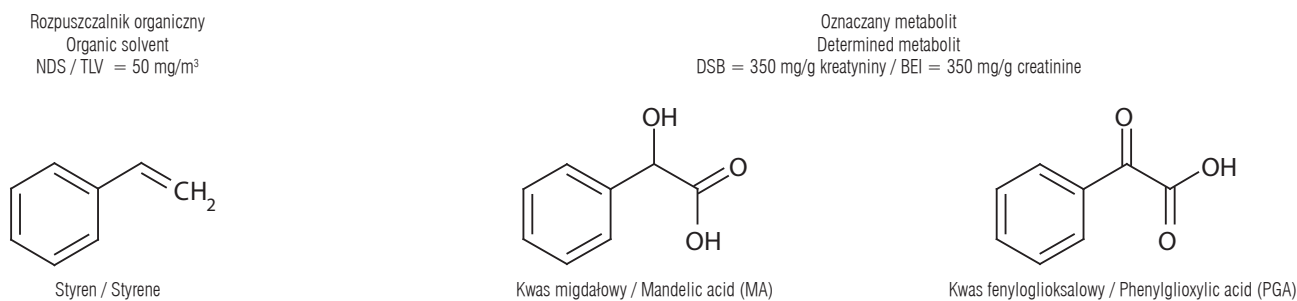
Cel pracy

Celem naszych badań było wykorzystanie techniki LC-MS/MS do opracowania czulej i specyficznej metody oznaczania metabolitów benzenu i styrenu w moczu.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki

Do wykonania oznaczeń wykorzystano: kwas S-fenylmerkapturowy o czystości 98% (prod. Toronto Research Chemicals Inc., Kanada), kwas migdałowy o czysto-



NDS – najwyższe dopuszczalne stężenie / TLV – threshold limit value; DSB – dopuszczalne stężenie biologiczne / BEI – biological exposure index.

Ryc. 2. Wartości normatywne dla styrenu (7,24)

Fig. 2. Limit values for styrene (7,24)

ści 99% i fenyloglioksalowy o czystości 97% (prod. Sigma-Aldrich, Niemcy), octan etylu (prod. Lab-Scan, Irlandia), kwas mrówkowy, wodę do LC-MS i metanol do HPLC (prod. J.T. Baker, Holandia).

Przyrządy pomiarowe

W badaniu wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Alliance 2695 (prod. Waters, USA) oraz tandemowy spektrometr mas Micromass Quattro Micro API (prod. Waters, USA).

Zasada oznaczania polega na chromatograficznym rozdiale (HPLC) odpowiednio przygotowanej próbki moczu i rejestracji w detektorze (MS/MS) specyficznych par jonów – molekularnych i fragmentacyjnych (potomnych).

Przechowywanie próbek do badań

Próbki do czasu wykonania analiz należy przechowywać w temperaturze -20°C . Uwzględniając wyniki badań termicznej stabilności metabolitów styrenu, zaleca się, aby analizę próbek moczu przeprowadzić w krótkim czasie od pobrania lub natychmiast zamrozić w temperaturze -20°C (21).

Przygotowanie próbek

Bezpośrednio przed analizą mocz rozmrażano i wirovano przy prędkości 11 000 rcf przez 10 min. Do analizy S-PMA pobrano 0,5 ml supernatantu, rozcieńczano go wodą do 1 ml i zakwaszono 50 μl stężonego kwasu mrówkowego, a następnie ekstrahowano 1,5 ml octanu etylu. Po rozdzieleniu faz warstwę organiczną odparowywano do sucha w atmosferze azotu, w temperaturze 37°C . Suchy ekstrakt rozpuszczano w 1 ml fazy chromatograficznej (metanol – 0,04 M kwas mrówkowy).

Na kolumnę chromatograficzną wprowadza się 20 μl ekstraktu. W celu analizy MA i PGA do 0,5 ml supernatantu dodaje się 300 μl wody i 200 μl 0,1 M kwasu mrówkowego. Na kolumnę chromatograficzną wprowadza się 20 μl roztworu końcowego. Równoległe z próbkami badanymi analizowano również próby materiału certyfikowanego oraz próbę zerową odczynnikową (wodę zamiast moczu).

Krzywe kalibracyjne

Roztwory robocze metabolitów benzenu i styrenu w metanolu do wykonania krzywej kalibracyjnej przygotowywano przed każdą serią analiz. Dla metabolitu benzenu – kwasu S-fenylomerkapturowego – zakres roboczy jest 10-punktowy: 1,0–2000 $\mu\text{g/l}$, a dla metabolitów styrenu 9-punktowy: 1,0–1000 mg/l .

Walidacja

Metody oznaczania metabolitów benzenu i styrenu zostały zwalidowane zgodnie z kryteriami normy ISO/IEC 17025:2005 (22), która obejmuje zakres roboczy, liniowość wyrażoną współczynnikiem korelacji r , wyznaczonym z programu QuanLynx v 4.0, granicę wykrywalności (limit of detection – LOD) odpowiadającej stosunkowi sygnału analitu do poziomu szumów, $S/N = 3$, precyzję wyrażoną jako względne odchylenie standardowe (relative standard deviation – RSD) oraz odzysk wyznaczony na podstawie analizy prób domieszkowanych.

Sterowanie jakością badań

Prawidłowość oznaczeń metabolitów benzenu i styrenu potwierdzono: a) stosując wewnętrzną kontrolę jakości badań – analizę materiału odniesienia ClinCheck®UrineControl (Level 1), oraz b) poprzez udział w zewnętrznej kontroli jakości, w międzynarodowym systemie badań biegłości G-EQUAS (German External Quality Assessment) (23).

Badania dodatkowe

W celu korekcji wielkości diurezy w pobranych próbkach moczu oznaczono stężenie kreatyniny metodą Jaffe. Dodatkowo w przypadku narażenia na benzen, szczególnie w ocenie narażenia środowiskowego, istotne jest zweryfikowanie statusu palenia. W tym celu dokonano pomiaru stężenia kotyniny w moczu (markera narażenia na dym tytoniowy) akredytowaną metodą LC-MS/MS.

WYNIKI

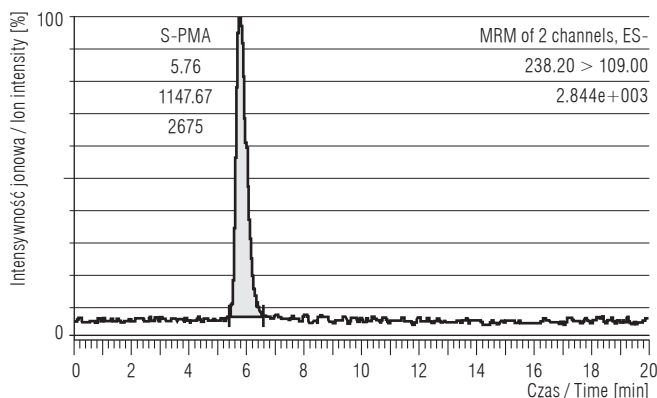
Na rycinie 3. przedstawiono przykładowe chromatogramy prób kontroli międzylaboratoryjnej G-EQUAS, a w tabeli 1. zamieszczono optymalne warunki chromatograficzne dla metabolitów benzenu i styrenu.

Doboru optymalnych warunków pracy detektora mas dokonano, analizując roztwory wzorcowe w stężeniu 1 mg metabolitu / 1 ml metanolu. Szczegółowe parametry przedstawiono w tabeli 2.

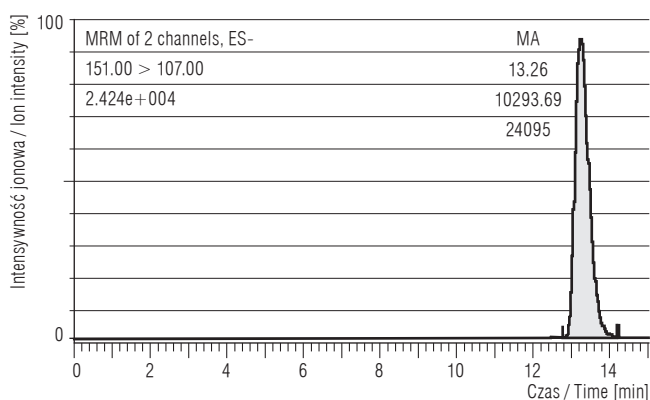
Procedury ilościowego oznaczania metabolitów benzenu i styrenu w moczu zostały zwalidowane w określonych zakresach stężeń. Parametry metod – tj. zakres roboczy, liniowość, granicę wykrywalności, granicę oznaczania ilościowego, średnią precyzję metody i średni odzysk – przedstawiono w tabeli 3.

Uzyskane wyniki wewnętrznej kontroli jakości badań – materiału odniesienia ClinCheck®Urine Control (Level 1) – oraz zewnętrznej kontroli jakości G-EQUAS przedstawiono w tabeli 4.

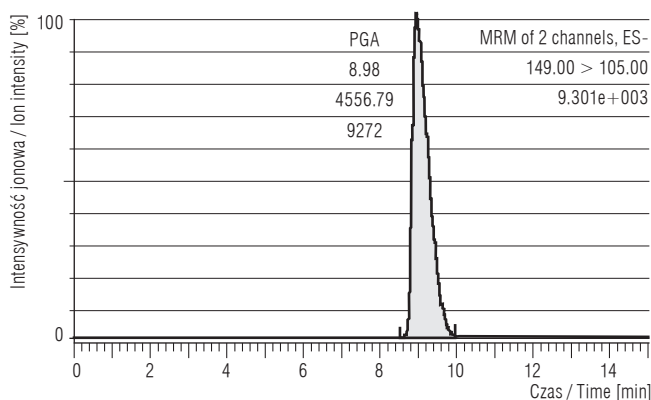
a) kwas S-fenylmercapturowy / S-phenylmercapturic acid (S-PMA)



b) kwas migdałowy / mandelic acid (MA)



c) kwas fenylglioksalowy / phenylglyoxylic acid (PGA)



Ryc. 3. Rozdział chromatograficzny próbek moczu materiału kontrolnego G-EQUAS zawierającego metabolity w stężeniach poniżej DSB: a) S-PMA = 26,3 µg/l, b) MA = 117,2 mg/l, c) PGA = 34 mg/l

Fig. 3. Chromatograms of urine samples of control material – G-EQUAS, containing metabolites in concentrations below the BEI: a) S-PMA = 26.3 µg/l, b) MA = 117.2 mg/l, c) PGA = 34 mg/l

Wykonanie oznaczeń metabolitów benzenu i styrenu u osób narażonych zawodowo

Weryfikację przydatności opracowanej metody przeprowadzono, wykonując oznaczenia w próbach moczu pobranych od osób narażonych zawodowo – pracujących w drukarni papierów wartościowych, w której używa się specjalnych farb zawierających benzen (N = 18), lub pracujących przy produkcji kadłubów jachtowych, narażonych na styren (N = 3). Do oznaczeń metabolitów benzenu lub styrenu użyto próbek moczu pobranych od pracowników narażonych na benzen lub na styren pod koniec zmiany roboczej (24).

Wielkość narażenia pracowników porównano z wartościami zalecanymi dopuszczalnych stężeń biologicznych (DSB). U 18 pracowników narażonych zawodowo na benzen, w tym 8 palących, nie wykazano przekroczenia wartości DSB równej 25 µg S-PMA/g kreatyniny (24). U 12 osób stwierdzono stężenia poniżej 1,0 µg/l (granicy oznaczania ilościowego). W żadnej próbce moczu pracowników narażonych zawodowo na styren nie wykazano przekroczenia DSB, które dla sumy kwasów – migdałowego i fenylglioksalowego – wynosi 350 mg/g kreatyniny (24).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Do oznaczeń metabolitów benzenu i styrenu w moczu wykorzystuje się wiele technik analitycznych, które charakteryzują się różną czułością (wyrażaną jako granica wykrywalności – LOD), szczególnie ważną przy wyborze metody dla oceny narażenia środowiskowego. Do oznaczeń S-PMA w moczu stosowano metodę chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (LOD = 0,3–1 µg/l), GC-MS (LOD = 1–5 µg/l) oraz metody immunoenzymatyczne (ELISA) (LOD = 8 µg/l), które mają wiele ograniczeń związanych z przygotowaniem próbki, czułością i specyficnością (25). Podobne ograniczenia mają metody stosowane do analizy metabolitów styrenu techniką HPLC-UV-Vis (LOD = 0,7 mg/l) (26) i GC-MS (LOD = 1–2 mg/l) (27).

Przedstawione wyniki wskazują, że opracowana metoda LC-MS/MS charakteryzuje się wysoką specyficznością, selektywnością oraz krótkim czasem przygotowania i analizy próbek moczu. Granice wykrywalności opracowanych metod są porównywalne do opublikowanych przez Lovregio i wsp. (S-PMA LOD = 0,17 µg/l vs 0,20 µg/l (28)) lub niższe od otrzymanych przez Maniniego i wsp. (MA LOD = 60 µg/l, PGA LOD = 40 µg/l vs MA i PGA = 100 µg/l (29)). Zwiększa to ich użytecz-

Tabela 1. Warunki rozdzielania chromatograficznego dla metabolitów benzenu i styrenu
Table 1. Optimized chromatographic conditions for metabolites of benzene and styrene

Parametr Parameter	Ustawienia dla metabolitu benzenu Settings for metabolite of benzene	Ustawienia dla metabolitów styrenu Settings for metabolites of styrene
Kolumna chromatograficzna / Analytical column	XTerra C 18 MS 2,1×150 mm	XTerra C 18 MS 2,1×150 mm
Faza ruchoma / Mobile phase	metanol / methanol (A) 0,04 M kwas mrówkowy / formic acid (B) gradient (A = 60–100%)	metanol / methanol (10%) 0,06 M kwas mrówkowy / formic acid (90%)
Przepływ fazy ruchomej / Flow rate	0,2 ml/min	0,3 ml/min
Czas retencji / Retention time	kwas S-fenylmerkapturowy / / S-phenylmercapturic acid: 5,80±15%	kwas fenyloglioksalowy / phenylglyoxylic acid: 8,90±15% kwas migdałowy / mandelic acid: 13,20±15%

HPLC – wysokosprawny chromatograf cieczowy / high performance liquid chromatograph.

Tabela 2. Parametry pracy tandemowego spektrometru mas
Table 2. Optimized operating conditions for mass spectrometry

Parametr Parameter	Metabolit benzenu Benzene metabolite	Metabolity styrenu Styrene metabolites
Fragmentacja / Ion transition (m/z)	kwas S-fenylmerkapturowy / / S-phenylmercapturic acid: 238,2 → 109	kwas fenyloglioksalowy / phenylglyoxylic acid: 149 → 105 kwas migdałowy / mandelic acid: 151 → 107
Jonizacja / Ionization	ESI ⁻	ESI ⁻
Napięcie kapilary / Capillary energy [kV]	3,0	3,0
Napięcie źródła jonów / Ion energy [V]	19	20
Temperatura źródła jonów / Source temperature [°C]	110	150
Temperatura desolwacji / Desolvation temperature [°C]	250	250
Przepływ azotu desolwacji [l/godz.] / Gas desolvation [l/h]	400	300
Energia kolizji / Collision energy	kwas S-fenylmerkapturowy / / S-phenylmercapturic acid: 10 eV	kwas fenyloglioksalowy / phenylglyoxylic acid: 8 eV kwas migdałowy / mandelic acid: 11 eV

m/z – stosunek masy do ładunku / mass-to-charge ratio.

ESI⁻ – jonizacja w elektrospreju / electrospray ionization.

Tabela 3. Cechy charakterystyki metod oznaczania metabolitów benzenu i styrenu zgodnych z ISO/IEC 17025:2005 (22)
Table 3. Characteristics of the methods for determining metabolites of benzene and styrene in accordance with ISO/IEC 17025:2005 (22)

Parametr walidacyjny Validation parameter	Metabolit benzenu Benzene metabolite	Ustawienia dla metabolitów styrenu Settings for metabolites of styrene	
	kwas S-fenylmerkapturowy S-phenylmercapturic acid	kwas fenyloglioksalowy phenylglyoxylic acid	kwas migdałowy mandelic acid
Zakres roboczy / Working range	1,0–2 000 µg/l	1,0–1 000 mg/l	1,0–1 000 mg/l
Liniowość / Linearity	0,999	0,999	0,999
Granica wykrywalności / Limit of detection (LOD)	0,33 µg/l	0,04 mg/l	0,06 mg/l
Granica oznaczania ilościowego / Limit of quantification (LOQ)	1,0 µg/l	1,0 mg/l	1,0 mg/l
Precyzja / Precision	3,08%	2,03%	3,05%
Odzysk / Recovery	98%	96%	94%

Tabela 4. Oznaczanie metabolitów benzenu i styrenu w kontroli wewnętrznej ClinCheck® i zewnętrznej G-EQUAS (48 porównanie międzylaboratoryjne)

Table 4. Benzene and styrene metabolites determination in internal quality control – ClinCheck® and external quality control G-EQUAS (48 intercomparison program)

Metabolit Metabolite	Kontrola jakości Quality control	Średnia Mean	Wartość referencyjna Reference value	Zakres wartości referencyjnych Tolerance range
Metabolit benzenu / Benzene metabolite [µg/l]				
kwas S-fenylmerkapturowy / S-phenylmercapturic acid	ClinCheck	30,4	27,0	20,0–34,0
	G-EQUAS A	13,0	13,9	10,6–17,2
	G-EQUAS B	21,0	25,5	20,7–30,3
Metabolity styrenu / Styrene metabolites [mg/l]				
kwas fenyloglioksalowy / phenylglyoxylic acid	ClinCheck	62,0	69,0	54,0–84,0
	G-EQUAS A	32,6	41,8	28,9–54,7
	G-EQUAS B	111,6	132,7	106,3–159,1
kwas migdałowy / mandelic acid	ClinCheck	168,5	148,0	121,0–175,0
	G-EQUAS A	115,4	110,1	88,5–131,7

ność, szczególnie w zakresie monitoringu narażenia środowiskowego. Oznaczane metabolity są czułymi i specyficznymi biomarkerami narażenia na benzen i styren. Przygotowanie próbek do analizy zostało maksymalnie uproszczone, a dobrany szeroki zakres roboczy pozwala na interpretację wyników w odniesieniu zarówno do obecnie obowiązujących normatywów higienicznych, jak i narażenia pozazawodowego. Wiarygodność uzyskanych wyników w pobranych próbach moczu była potwierdzona przez równoległą analizę próbek kontrolnych oraz wyniki udziału w międzynarodowych badaniach jakości analiz (G-EQUAS).

Weryfikację przydatności metody przeprowadzono analizując próby moczu osób zawodowo narażonych w zakresie poniżej obowiązujących wartości NDS.

PIŚMIENNICTWO

- Jakubowski M.: Biological monitoring versus air monitoring strategies in assessing environmental – occupational exposure. *J. Environ. Monit.* 2012;14:348–352. DOI: 10.1039/c1em10706b
- World Health Organization: Biological Monitoring of Chemicals Exposure in the Workplace. WHO, Geneva 1996
- Janasik B., Jakubowski M., Wesołowski W., Kucharska M.: Unmetabolized VOC's in urine as biomarkers of low level occupational exposure. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2010;23(1):21–26. DOI: 10.2478/v10001-010-0003-x
- Scarselli A., Binazzi A., di Marzio D.: Occupational exposure levels to benzene in Italy: findings from a national database. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2011;84: 617–625. DOI: 10.1007/s00420-011-0616-9
- International Agency for Research on Cancer: Summaries & Evaluations. Benzene. Supl. 7. IARC, 1987 Lyon, ss. 59–61 [cytowany 8 lutego 2012]. Adres: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf>
- Główny Inspektorat Sanitarny: Dane Stacji Sanitarnej-Epidemiologicznej w Bydgoszczy (2010) [materiał nieopublikowany]. GIS, Bydgoszcz
- Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Społecznej z dnia 29 listopada 2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. *DzU z 2002 r. nr 217, poz. 1833*
- World Health Organization: International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria. No. 150. WHO, Geneva 1993
- Weisel C.P.: Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem. Biol. Interact* 2010;184:58–66. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.12.030
- Fruin S.A., St Denis M.J., Winer A.M., Colome S.D., Lurmann F.W.: Reductions in human benzene exposure in the California South Coast Air Basin. *Atmos. Environ.* 2001;35:1069–1077
- Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie. Delegatura w Tarnowie: Sprawozdanie z badań zanieczyszczenia powietrza benzenem na obszarze województwa małopolskiego w 2010 roku. WIOŚ, Tarnów 2011
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 3 marca 2008 r. w sprawie poziomów niektórych substancji w powietrzu. *DzU z 2008 r. nr 47, poz. 281*
- Angelini S., Kumar R., Bermejo J.L., Maffei F., Barbieri A., Graziosi F. i wsp.: Exposure to low environmental levels of benzene: Evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid extraction in relation to poly-

- morphism in genes encoding metabolic enzymes. *Mutat. Res.* 2011;719:7–13. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.10.002
14. Westóó G.: On the metabolism of sorbic acid in the mouse. *Acta Chem. Scand.* 1964;18:1373–1378
 15. Manini P., de Palma G., Andreoli R., Poli D., Petyx M., Corradi M. i wsp.: Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policeman. *Toxicol. Lett.* 2008;181:25–30. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.06.865
 16. National Toxicology Program. Final Report on Carcinogens Background Document for Styrene. Research Triangle Park, NC. US Department of Health and Human Services. Public Health Services. Program, Durham 2008
 17. Miller R.R., Newhoooh R., Poole A.: Styrene production, use, and human exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 1994;24:S1–S10
 18. International Agency for Research on Cancer: Styrene (Group 2B). Tom 60. IARC, 1994, Lyon, ss. 11–14 [cytowany 8 lutego 2012]. Adres: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf>
 19. International Agency for Research on Cancer: Styrene-7,8-oxide (Group 2A). Tom. 60. IARC, 1994, Lyon ss. 15–16 [cytowany 8 lutego 2012]. Adres: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf>
 20. International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Tom 82. IARC, 2002, ss. 437–440, Lyon
 21. Eitaki Y., Kawai T., Kishi R., Sakurai H., Ikeda M.: Stability in urine of authentic phenylglyoxylic and mandelic acids as urinary markers of occupational exposure to styrene. *J. Occup. Health* 2008;50:221–228
 22. PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2005
 23. German External Quality Assessment (G-EQUAS): Institute of Occupational Social and Environmental Medicine of the University of Erlangen, Nuremberg [cytowany 18 czerwca 2012]. Adres: <http://www.g-equas.de>
 24. Centralny Instytut Ochrony Pracy: Czynniki szkodliwe w środowisku pracy. Wartości dopuszczalne. CIOP, Warszawa 2010
 25. Farmer P.B., Kaur B., Roach J., Levy L., Consonni D., Bertazzi P.A. i wsp.: The use of S-phenylmercapturic acid as a biomarker in molecular epidemiology studies of benzene. *Chem. Biol. Interact.* 2005;153–154:97–102. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.03.013
 26. Jin-Zhao W., Xin-Yan L., Na-Ping Z., Yi-Yu C., Su Z.: Simultaneous determination of phenylglyoxylic acid, mandelic acid, styrene glycol and hippuric acid in primary culture of rat hepatocytes incubate by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2007;21:497–501. DOI: 10.1002/bmc783
 27. Szucs S., Toth L., Legoza J., Sarvary A., Adany R.: Simultaneous determination of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Arch. Toxicol.* 2002;76:560–569. DOI: 10.1007/s00204-002-0384-0
 28. Lovreglio P., Barbieri A., Carrieri M., Sabatini L., Fracaso M.E., Doria D. i wsp.: Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2010;83:341–356. DOI: 10.1007/s00420-009-0469-7
 29. Manini P., Andreoli R., Poli D., de Palma G., Mutti A., Niessen W.M.A.: Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002;16:2239–2248. DOI: 10.1002/rcm.848