

# Optimiranje uvjeta analize S-fenilmerkapturane kiseline u mokraći primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa

---

Cindrić, Doroteja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:466382>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Doroteja Cindrić

**Optimiziranje uvjeta analize *S*-  
fenilmerkapturne kiseline u mokraći  
primjenom vezanog sustava plinski  
kromatograf-spektrometar masa**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2021.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Irene Brčić Karačonji. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.



## Zahvale

*Najprije, najveća hvala mojoj mentorici dr. sc. Ireni Brčić Karačonji na prilici koju mi je pružila. Hvala za svaku uloženu minutu, za svaki prijedlog i savjet. Bilo mi je veliko zadovoljstvo biti dio Vašeg labosa.*

*Hvala na velikoj podršci koja će mi biti kao odskočna daska u novi svijet nakon fakulteta.*

*Hvala mojim sestrama, svoj rodbini i prijateljima koji su me podržavali i vjerovali u mene.*

*Posebno hvala mojim prijateljima, mojoj ekipi s faksa, mojim cimericama i ekipi s Puhačkog orkestra Željezničar, s kojima sam provodila dane i noći u Zagrebu. Bez vas studentski život ne bi imao smisla.*

*I na kraju, najveće hvala mojoj mami Mirjani kojoj posvećujem ovaj rad jer mi je sve ovo omogućila i bez koje ništa od ovoga ne bih postigla.*

*Hvala što si vjerovala u mene!*



## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Cilj istraživanja .....	2
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
2.1. Benzen .....	3
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva benzena .....	3
2.1.2. Izvori benzena i njegova proizvodnja .....	3
2.1.3. Toksičnost benzena .....	4
2.2. Toksikokinetika S-fenilmerkapturane kiseline (S-PMA) .....	4
2.3. Toksikokinetika benzena .....	6
2.4. Biološko praćenje izloženosti benzenu .....	7
2.4.1. S-PMA u mokraći kao biomarker.....	9
2.4.2. ttMA u mokraći kao biomarker .....	10
2.5. Analitičke tehnike za određivanje koncentracije S-PMA u mokraći .....	10
2.5.1. GC-MS .....	11
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. Kemikalije.....	12
3.2. Priprava standardnih otopina.....	12
3.3. Instrumentacija i pribor .....	13
3.4. Ispitanici.....	13
3.5. Ekstrakcija S-PMA iz uzoraka mokraće .....	14
3.6. Plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) .....	14
3.7. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije S-PMA .....	14
3.7.1. Ispitivanje sredstava za derivatizaciju, uz dodatak bezvodnog natrijevog sulfata i bez njegovog dodatka.....	15
3.7.2. Ispitivanje pH-vrijednosti dodatkom klorovodične kiseline.....	15
3.7.3. Ispitivanje vrste otapala za ekstrakciju S-PMA .....	16
3.7.4. Ispitivanje volumena mokraće.....	16
3.7.5. Ispitivanje otapala za suhi ekstrakt.....	16
3.7.6. Ispitivanje uvjeta derivatizacije .....	16
3.8. Određivanje masene koncentracije kreatinina u mokraći .....	16



---

3.9. Validacija .....	17
3.10. Statistička obrada podataka .....	18
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>19</b>
4.1. Optimiziranje uvjeta derivatizacije S-PMA .....	19
4.1.1. Izbor sredstva za derivatizaciju S-PMA uz dodatak natrijevog sulfata ili bez njegovog dodatka.....	19
4.1.2. Optimiziranje uvjeta derivatizacije.....	20
4.2. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije S-PMA iz mokraće.....	20
4.2.1. Zakiseljavanje uzorka klorovodičnom kiselinom .....	20
4.2.2. Izbor otapala za ekstrakciju.....	21
4.2.3. Optimiziranje volumena mokraće za ekstrakciju .....	21
4.2.4. Izbor otapala za suhi ekstrakt .....	21
4.3. Rezultati validacije analitičke metode.....	22
4.4. Određivanje masene koncentracije S-PMA u mokraći ispitanika .....	23
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>25</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>26</b>
<b>§ 7. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XX</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Optimiziranje uvjeta analize *S*-fenilmerkapturane kiseline u mokraći primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa

Doroteja Cindrić

Benzen je aromatski spoj s kancerogenim svojstvima kojem su ljudi, osim profesionalno, izloženi putem cigaretnog dima ili ispušnih plinova motornih vozila. *S*-Fenilmerkapturana kiselina (*S*-PMA) smatra se specifičnim pokazateljem izloženosti benzenu kod opće populacije i pri profesionalnoj izloženosti. Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati uvjete ekstrakcije *S*-PMA iz mokraće te razviti i validirati osjetljivu i specifičnu analitičku metodu za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa. Predložena metoda je pokazala dobru linearnost ( $R^2 > 0,9996$ ) u ispitivanom koncentracijskom rasponu ( $0,5 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), preciznost ( $\text{RSD} < 7 \%$ ), točnost ( $> 95 \%$ ) i osjetljivost (granica detekcije:  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$  i granica kvantifikacije:  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Metoda je primijenjena za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći 20 ispitanika koji nisu bili profesionalno izloženi benzenu. Pušači ( $N=10$ ) su imali značajno višu koncentraciju *S*-PMA u mokraći u usporedbi s nepušačima ( $N=10$ ).

(27 stranica, 4 slike, 2 tablice, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: benzen, ekstrakcija, mokraća, plinski kromatograf, spektrometar masa, *S*-PMA

Mentor: dr. sc. Irena Brčić Karačonji, v. zn. sur.

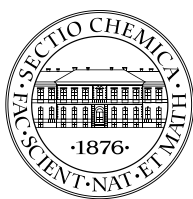
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
  3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 29. 09. 2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Optimising the conditions for *S*-phenylmercapturic acid analysis in urine using gas chromatography-mass spectrometry

Doroteja Cindrić

Benzene is an aromatic compound with carcinogenic properties to which people, except in professional settings, are exposed by cigarette smoke or motor vehicle exhaust. *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA) is considered a specific marker of benzene exposure in the general and occupationally exposed population. The aim of this study was to optimise the conditions of *S*-PMA extraction from urine and to develop and validate a sensitive and specific analytical method for determining the mass concentration of *S*-PMA in urine using gas chromatography-mass spectrometry. The proposed method showed good linearity ( $R^2 > 0,9996$ ) in the examined concentration range ( $0,5 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), good precision (RSD  $< 7\%$ ), accuracy ( $> 95\%$ ) and sensitivity (limit of detection:  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$  and limit of quantification:  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The method was applied to determine the mass concentration of *S*-PMA in the urine of 20 subjects who were not occupationally exposed to benzene. Smokers ( $N = 10$ ) had a significantly higher concentration of *S*-PMA in urine compared to non-smokers ( $N = 10$ ).

(27 pages, 4 figures, 2 tables, 29 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: benzene, extraction, gas chromatograph, mass spectrometer, *S*-PMA, urine

Mentor: Dr. Irena Brčić Karačonji, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor
3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: Sep. 29. 2021.



## § 1. UVOD

Benzen je hlapljivi aromatski ugljikovodik koji se nalazi u nafti i njenim derivatima te u otapalima koja se upotrebljavaju u proizvodnji raznovrsnih materijala, poput gume, boja, ljepila, sredstava za odmašćivanje i slično.<sup>1</sup> Glavni izvori izloženosti benzenu u općoj populaciji su duhanski dim i ispušni plinovi vozila koja sadrže motor s unutarnjim izgaranjem. Profesionalna izloženost benzenu prisutna je u radnika u petrokemijskoj industriji te u proizvodnji koja zahtijeva upotrebu otapala i ljepila.<sup>2</sup> Nakon unosa benzena u organizam (udisanjem ili preko kože), dio apsorbiranog benzena izlučuje se mokraćom u obliku metabolita.<sup>1</sup> Budući da biotransformacijom benzena nastaju reaktivni elektrofilni međuproducti koji mogu reagirati sa staničnim proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama uzrokujući mutacije ili maligne promjene, Međunarodna agencija za istraživanje raka uvrstila je benzen u skupinu ljudskih kancerogena.<sup>3</sup>

Razina izloženosti benzenu procjenjuje se određivanjem karakterističnih pokazatelja u biološkim uzorcima tzv. biološkim praćenjem (monitoringom). *S*-Fenilmerkaptorna kiselina (*S*-PMA) nastaje u reakciji benzenova oksida i glutationa i izlučuje se putem mokraće te se smatra specifičnim pokazateljem izloženosti benzenu kod opće populacije i pri profesionalnoj izloženosti.<sup>2,4</sup> Uvrštena je u Pravilnik o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima (NN 91/2018). Biološka granična vrijednost za *S*-PMA u mokraći uzorkovanoj na kraju radne smjene iznosi 46  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina.

Prema dostupnim literaturnim izvorima, metode za analizu *S*-PMA u mokraći primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS)<sup>5,6,7</sup> nisu uključivale optimiziranje uvjeta ekstrakcije otapalom s ciljem postizanja što većeg analitičkog povrata *S*-PMA.

## 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati uvjete ekstrakcije *S*-PMA, metabolita benzena, iz mokraće ispitanika iz opće populacije te razviti i validirati osjetljivu i specifičnu analitičku metodu za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS). Ispitani su čimbenici koji utječu na ekstrakciju (pH-vrijednost, vrsta i volumen organskog otapala) i na derivatizaciju *S*-PMA (različita sredstva za derivatizaciju, temperatura i vrijeme reakcije). Predloženom validiranom metodom određena je masena koncentracija *S*-PMA u mokraći 10 nepušača i 10 pušača, a istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i uz suglasnost Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Benzen

#### 2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva benzena

Benzen (cikloheksatrien, benzol, CAS No 71-43-2) je tekućina kemijske formule C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Točka vrelišta iznosi mu 80,1 °C pri 1,013 hPa, gustoća 0,88 g cm<sup>-3</sup>, tlak para 10 kPa pri 20 °C, koeficijent raspodjele *n*-oktanol-voda 2,13 pri 25 °C, topljivost u vodi 1,88 g L<sup>-1</sup> pri 23,5 °C. U skladu s Člankom 2 (b) iz Direktive 98/24/EC (EU Parliament and Council Directive 1998) benzen je opasno kemijsko sredstvo, a prema Članku 2 (a) i (b) iz Direktive 2004/37/EC (EU Parliament and Council Directive 2004) kancerogen i mutagen za ljude. Dodatak III iz Direktive 2004/37/EC navodi graničnu vrijednost za profesionalnu izloženost benzenu u radnom prostoru koja iznosi 1 ppm (3,25 mg m<sup>-3</sup>), uz napomenu da postoji značajan doprinos ukupnom tjelesnom opterećenju benzenom putem izloženosti preko kože.<sup>8</sup>

#### 2.1.2. Izvori benzena i njegova proizvodnja

Registrirano je 128 supstanci koje sadrže benzen masenog udjela od 0,1 do 1,0 % i 97 supstanci koje ga sadrže u količini višoj od 1,0 %. Najvažniji izvori benzena su nafta, destilati iz petroleja ili katrana i benzin. Prema EU Direktivi 98/70/EC, dopunjenoj s Direktivom 2003/17/EC, benzin smije sadržavati do 1 % (v/v) benzena. Benzen se nalazi i u duhanskom dimu.<sup>8</sup> Jedna cigareta sadrži 15 – 59 µg benzena.<sup>9</sup>

Proizvodi se u petrokemijskoj industriji frakcijskom destilacijom sirove nafte, kreiranjem parom i dealkilacijom. Također, može se dobiti tijekom proizvodnje kemikalija iz ugljena, primarno iz nusproizvoda koksa. Iz spomenutih izvora benzen se ekstrahira i pročišćava za industrijsku upotrebu.<sup>8</sup>

Koristi se i kao međuprodukt u proizvodnji mnogih kemijskih spojeva, poput stirena, kumena (izopropilbenzena) i cikloheksana, koji se koriste u proizvodnji plastike, različitih smola, najlona i sintetičkih vlakana. Također se koristi u proizvodnji različitih vrsta guma, maziva, bojila, deterdženata, lijekova i pesticida. Proizvodi koji također mogu sadržavati benzen su laboratorijske kemikalije, proizvodi za premazivanje, punila, flasteri, glina za modeliranje, proizvodi za tretiranje nemetalnih površina, regulatori pH, proizvodi za tretiranje vode i polimeri.<sup>8</sup>

### 2.1.3. Toksičnost benzena

Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research for Cancer*, IARC) uvrstila je benzen u spojeve koji su kancerogeni za ljude.<sup>3</sup> Za kancerogena svojstva odgovorni su međuprodukti u metaboličkom putu razgradnje benzena. Izloženost benzenu povezana je s iritacijama kože i očiju (pri koncentracijama u zraku koje su više od 105 mg m<sup>-3</sup>), s kardiovaskularnim, gastrointestinalnim, neurološkim i bubrežnim poremećajima (pri koncentracijama 960 – 9600 mg m<sup>-3</sup>), s depresijom središnjeg živčanog sustava i sa smrću (tijekom izlaganja 5 – 10 minuta koncentraciji koja iznosi 64000 mg m<sup>-3</sup>).<sup>9</sup> Moguće je i štetno djelovanje benzena na imunološki sustav, pri čemu dolazi do oštećenja antitijela i leukocita (pri koncentracijama 3 – 96 mg m<sup>-3</sup>).<sup>9</sup> Benzen se smatra važnim čimbenikom koji doprinosi razvoju raznih bolesti i anomalija, poput leukemije, kardiovaskularnih bolesti, anomalije sperme, respiratornih bolesti i kromosomskih anomalija. Costa-Amaral i sur. proveli su istraživanje na staničnoj kulturi limfocita iz periferne krvi radnika izloženih benzenu i zaključili da prekomjerno izlaganje čak i nižim masenim koncentracijama benzena (15 µg m<sup>-3</sup>) uzrokuje kromosomske abnormalnosti, lomove, nastajanje fragmenata i preuranjeno kromosomsko dijeljenje.<sup>1</sup>

Sørensen i sur. istražili su vezu između izloženosti benzenu i oštećenja DNA u 10 ispitanika koji su radili na otvorenom i 30 ispitanika zaposlenih u uredima.<sup>5</sup>

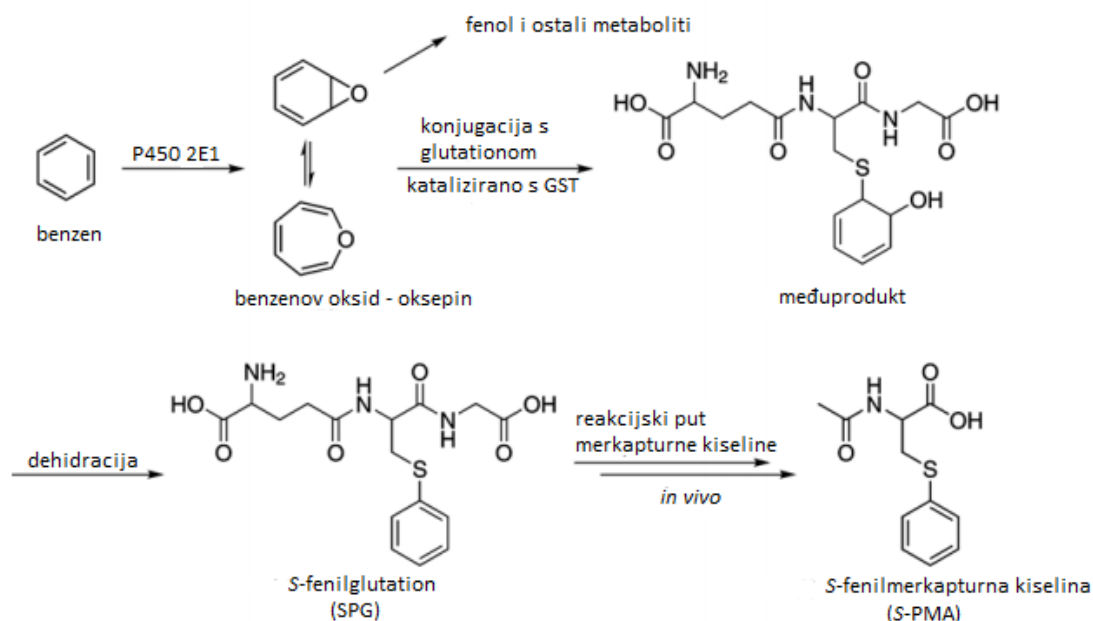
Utvrđena je značajna korelacija između izlučivanja *S*-PMA i 7-hidro-8-okso-2'-deoksigvanozina (8-oksodG), pokazatelja oksidacijskog oštećenja DNA u limfocitima.

U ovom radu, izloženost benzenu iznosila je 2,5 µg m<sup>-3</sup>, što je relativno nisko, a mjerila se tijekom pet dana uporabom osobnih dozimetara, za razliku od mjerenja *S*-PMA u mokraći i pokazatelja oksidacijskog stresa u limfocitima koji su se mjerili u samo jednom od ovih dana. Upravo ta činjenica, da su se biomarkeri izloženosti i učinka mjerili u jednome danu, može objasniti postojanje spomenute korelacije između *S*-PMA i 8-oksodG-a, a ne između vanjske izloženosti benzenu i 8-oksodG-a.<sup>5</sup>

## 2.2. Toksikokinetika *S*-fenilmerkapturane kiseline (*S*-PMA)

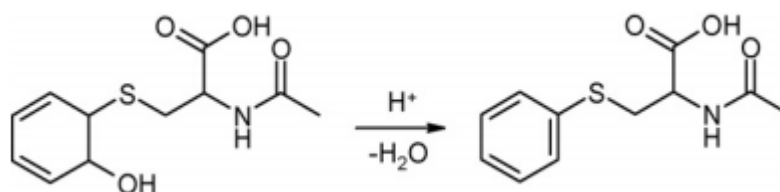
*S*-PMA jedan je od metabolita benzena koji se stvara u organizmu nakon izloženosti benzenu. Kao mjeru izloženosti benzenu, najbolje je određivati količinu prisutne *S*-PMA u mokraći. Utvrđeno je da je *S*-PMA najosjetljiviji i najspecifičniji biomarker, posebno za

procjenu niske izloženosti benzenu.<sup>10</sup> Metabolički put do nastanka *S*-PMA obuhvaća oksidaciju benzena u benzenov oksid pomoću citokroma P450 2E1, konjugaciju benzenovog oksida s glutationom (GSH) u 1-(*S*-glutationil)-cicloheksa-3,5-dien-2-ol, iz kojeg dehidracijom u kiselom mediju nastane *S*-fenilglutation (SPG) te iz njega konačno u *in vivo* uvjetima nastane *S*-PMA (Slika 1.).



Slika 1. Metabolički put benzena do *S*-PMA. Preuzeto i prilagođeno prema Haiman i sur.<sup>4</sup>

Međutim, Sterz i sur. predložili su još jedan put nastanka *S*-PMA koji uključuje nastanak pre-*S*-PMA iz 1-(*S*-glutationil)-cikloheksa-3,5-dien-2-ola iz koje dehidracijom u kiselim uvjetima nastaje *S*-PMA (Slika 2.).



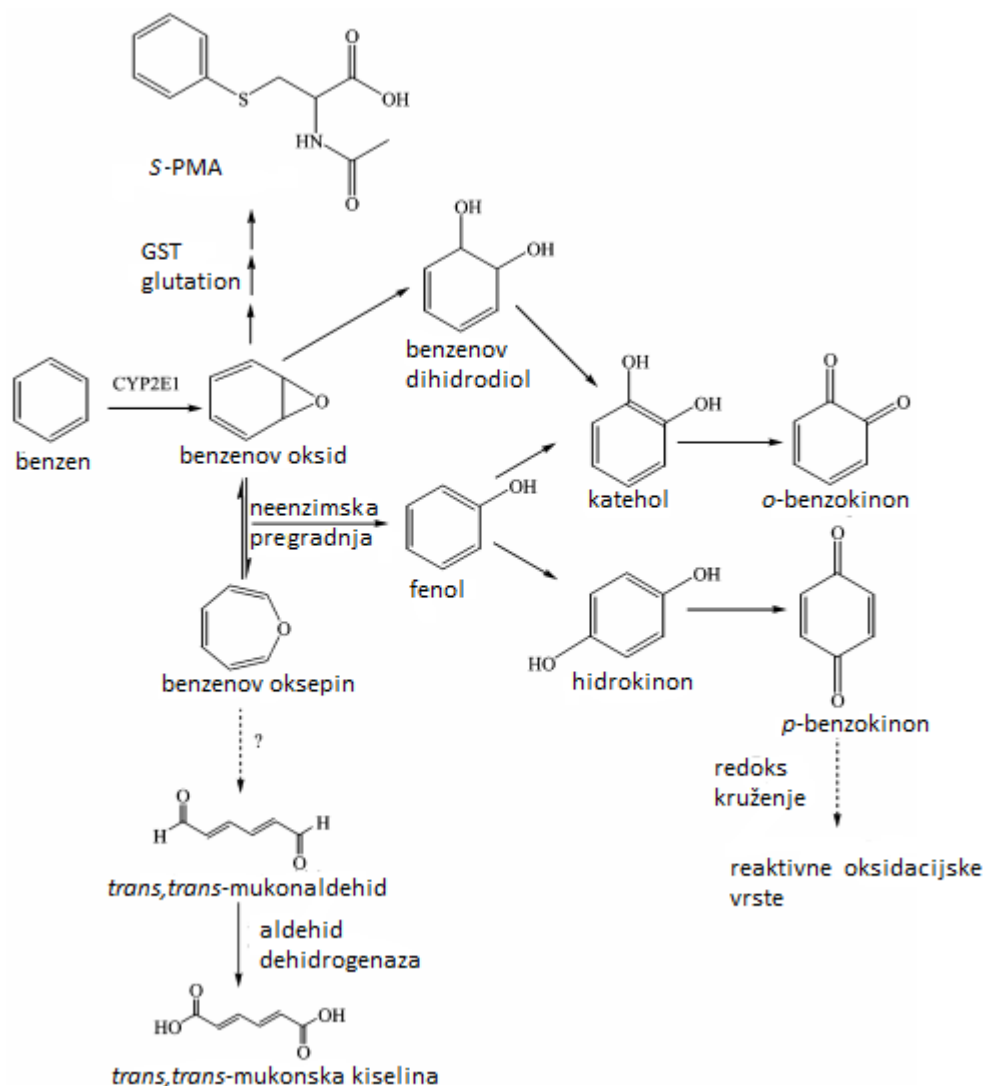
Slika 2. Pretvorba pre-*S*-PMA u *S*-PMA kiselinom kataliziranom reakcijom. Preuzeto i prilagođeno prema Sterz i sur.<sup>10</sup>

### 2.3. Toksikokinetika benzena

Benzen u organizam može ući udisanjem, preko kože i oralno, pri čemu je njegovo udisanje od najveće važnosti pri profesionalnoj izloženosti. Udahnuti benzen difundira u pluća, nakon čega se apsorbira u krvotok. Prema Nizozemskom stručnom odboru za zaštitu na radu (DECOS 2014), srednja vrijednost apsorpcije benzena udisanjem kod ljudi iznosi 50 – 80 %. U organizam se apsorbira trenutno, s obzirom na svoju veliku hlapljivost i lipofilnost. Doprinos apsorpcije benzena preko kože jako je mali, s obzirom da dolazi do njegovog isparavanja s površine kože.<sup>8</sup> Nakon metaboliziranja benzena u benzenov oksid postoji mogućnost da oksid iz jetara, gdje nastaje, cirkulacijom migrira do stanica koštane srži, stimulira ih, uzrokuje njihovu proliferaciju i u konačnici uzrokuje razvoj leukemije.<sup>1</sup> Spomenute aktivnosti uključuju i oksidacijski stres DNA i drugih makromolekula nakon mogućeg ulaska metabolita u samu stanicu i remećenja staničnog ciklusa. Dolaskom metabolita u stanicu može doći i do apoptoze (programirane stanične smrti) prekursorskih stanica u hematopoetskom sustavu (u sustavu stvaranja krvnih stanica), pri čemu se onda mijenjaju bitni stanični signalni putevi unutar sustava, što onda u konačnici rezultira s toksičnošću stanice.<sup>1</sup> Metabolizam benzena u ljudi je učinkovitiji kada su izloženi nižim koncentracijama benzena i tada je rizik od leukemije puno veći. Međutim, još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno koji je metabolit benzena odgovoran za toksične učinke. Oni mogu nastati zbog stvaranja kovalentne veze u određenim biomolekulama (recimo u tubulinu, histonima i topoizomerazi II), zbog nastanka oksidacijskih vrsta, zbog samooštećenja DNA pomoću DNA-veznih proteina, umrežavanja ili pucanja jednostruke ili dvostruke zavojnice te zbog kromosomskih abnormalnosti (posebno kod kromosoma 5 i 7 koji su uključeni u razvoj akutne mijelocitne leukemije).<sup>11</sup> Procijenjen rizik dobivanja leukemije je u približno šest slučajeva od milijun, među ljudima koji su cijelog života izloženi benzenu iz zraka u koncentracijama od  $1 \mu\text{g m}^{-3}$ .<sup>12</sup>

Benzen se primarno metabolizira u jetri, a onda se metaboliti mogu transportirati u koštanu srž gdje dolazi do sekundarnog metaboliziranja koji može doprinijeti toksičnosti stanica.<sup>10</sup> Vrijeme polueliminacije *S*-PMA, kao metabolita benzena, iznosi oko 9 h, te je stoga prikladna kao biomarker izloženosti benzenu u ljudi.<sup>13</sup>

Iz nastalog benzenovog oksida mogu nastati i određeni benzokinoni koji će u redoks reakcijama dati reaktivne oksidacijske vrste (Slika 3.).



Slika 3. Metabolički putevi benzena. Preuzeto i prilagođeno prema Sørensen i sur.<sup>5</sup>

Postoji enzim koji takve reakcije može spriječiti, a radi se o NAD(P)H:kinon-oksido-reduktazi (NQO) koja nastale kinone prevodi u manje toksične spojeve kroz njihovu redukciju i na taj način štiti stanice od oksidacijskog stresa.<sup>14</sup>

## 2.4. Biološko praćenje izloženosti benzenu

Biološko praćenje izloženosti benzenu na općoj populacijskoj razini prepoznato je kao vrlo bitno javnozdravstveno pitanje zbog toksičnosti benzena, čak i pri vrlo niskim koncentracijama.<sup>15</sup> Biomarkeri izloženosti benzenu uključuju nemetabolizirani benzen u krvi, izdah i mokraći, metabolite benzena u mokraći i adukte benzena s molekulom DNA,

hemoglobinom i albuminom.<sup>2</sup> Analize nemetaboliziranog benzena najčešće uključuju ekstrakcijske postupke bez otapala (statička i dinamička analiza para iznad uzorka), nakon čega obično slijedi analiza tehnikom GC-MS, a najveći nedostatak je gubitak analita kod pripreve uzoraka zbog hlapljivosti benzena.<sup>2</sup> Hidrokinon, katehol i fenol su metaboliti koji zahtijevaju ekstrakciju s otapalom ili ekstrakciju na čvrstoj fazi, nakon čega slijedi analiza plinskom kromatografijom s plamenoionizacijskom detekcijom (engl. *Gas Chromatography-Flame Ionisation Detector*, GC-FID) ili spektrometrijom masa (GC-MS) te tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV detekcijom (engl. *High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection*, HPLC-UV) ili tandemnom spektrometrijom masa (engl. *High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS).<sup>2</sup> Ovi metaboliti se izlučuju u obliku glukuronida ili sulfatnih konjugata koji su veće polarne molekule pa je onda, u slučaju plinskokromatografske analize koja se rabi za molekule manje mase i polarosti, potrebna kiselinska ili enzimaska hidroliza.<sup>2</sup> *S*-PMA i *t,t*MA nalaze se u mokraći u puno nižim koncentracijama u odnosu na prethodno spomenute metabolite, stoga zahtijevaju pri analizi mnogo veću redukciju volumena ekstrakta otapala i puno osjetljivije analitičke metodologije.<sup>2</sup> Koncentracija navedenih biomarkera u mokraći ovisi o vremenu uzorkovanja, navici pušenja i indeksu tjelesne mase.<sup>15</sup>

Američka udruga vladinih industrijskih higijeničara (engl. *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, ACGIH) predložila je da biološka granična vrijednost (engl. *Biological exposure indices*, BEI) za benzen u mokraći iznosi 25 µg *S*-PMA po gramu kreatinina. Vrijednosti BEI-a za benzen temeljene su na iznosu granične vrijednosti izloženosti (engl. *Threshold Limit Value–Time-Weighted Average*, TLV–TWA) od 0,5 ppm. Granična vrijednost izloženosti je prosječna koncentracija tvari u zraku na mjestu rada, u zoni disanja radnika u odnosu na referentno razdoblje od osam sati, a iznad koje radnik ne bi smio biti izložen tijekom rada u punoj smjeni.<sup>16</sup>

Europska kemijska agencija (engl. *European Chemicals Agency*, ECHA) predložila je biološku graničnu vrijednost (engl. *Biological Limit Value*, BLV) za izloženost benzenu koja iznosi 2 µg *S*-PMA po gramu kreatinina i 0,7 µg benzena po litri mokraće.<sup>16</sup>

Biološka granična vrijednost (BGV) za izloženost benzenu u Pravilniku o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima (NN 91/2018) preuzeta je iz europskih direktiva i iznosi 46 µg *S*-PMA po gramu kreatinina.

#### 2.4.1. *S-PMA u mokraći kao biomarker*

Koncentracija *S-PMA* u mokraći nepušača koji nisu profesionalno izloženi benzenu iznosi 1 – 2  $\mu\text{g}$  po gramu kreatinina.<sup>13</sup> U nekoliko je istraživanja utvrđena značajna pozitivna korelacija između *S-PMA* u mokraći profesionalno izloženih ispitanika i koncentracije benzena u zraku.<sup>17–19</sup> Boogaard i van Sittert<sup>20</sup> procijenili su da bi prosječna koncentracija *S-PMA* u urinu nakon osmosatne izloženosti benzenu od 1 ppm (3,25  $\text{mg m}^{-3}$ ) iznosila 44  $\mu\text{g}$  po gramu kreatinina. U općoj populaciji koja je izložena benzenu zbog gradskog onečišćenja nije ustanovljena korelacija između benzena u zraku i *S-PMA* u mokraći.<sup>5</sup> U usporedbi s drugim metabolitima benzena, *S-PMA* se čini specifičnim i pouzdanim biomarkerom za izloženost benzenu, unatoč niskom stupnju biotransformacije benzena u *S-PMA* (0,005 – 0,3 %).<sup>21</sup>

Van Sittert i sur.<sup>20</sup> proveli su istraživanja u skupini radnika koji su potencijalno bili izloženi benzenu tijekom proizvodnje kemikalija, rada u rafineriji i postrojenjima za proizvodnju prirodnog plina. *S-PMA* je, osim u mokraći radnika, određena i u uzorcima mokraće 48 kontrolnih ispitanika (28 nepušača i 20 pušača) koji nisu bili profesionalno izloženi benzenu, od kojih je 28 nepušača i 20 pušača. Koncentracije *S-PMA* u mokraći kontrolnih osoba iznosile su < 2 – 6  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina i utvrđeno je da pušenje nema utjecaja na koncentraciju *S-PMA*. U profesionalno izloženih osoba određena je koncentracija *S-PMA* do 543  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina, a ovisila je o radnom mjestu te o vremenu prikupljanja uzoraka (početak i kraj radne smjene i radnog tjedna). Izmjerene koncentracije bile su više na kraju radne smjene i krajem radnog tjedna. Nakon osmosatne izloženosti benzenu iz zraka u koncentraciji od 1 ppm (3,25  $\text{mg m}^{-3}$ ), prosječna koncentracija *S-PMA* u uzorcima mokraće koji su skupljeni na kraju radnog vremena iznosila je 46  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina.

U istraživanju koje je uključivalo 42 ispitanika izloženih benzenu utvrđeno je da pušenje cigareta utječe samo na određene metabolite (povećava se razina hidrokinona i mukonske kiseline u mokraći, ali nema utjecaja na koncentraciju fenola, katehola, trihidroksibenzena i *S-PMA*). U 42 ispitanika koji nisu bili profesionalno izloženi benzenu, srednje vrijednosti svih metabolita su bile više u pušača. Tako je, npr., koncentracija *S-PMA* u mokraći pušača bila 0,029  $\text{mg L}^{-1}$ , a u nepušača 0,016  $\text{mg L}^{-1}$ .<sup>23</sup>

#### 2.4.2. *ttMA* u mokraći kao biomarker

Iako *ttMA* nije specifičan biomarker kao *S-PMA*, budući da može nastati u organizmu iz sorbinske kiseline koja je konzervans u hrani, Aprea i sur.<sup>24</sup> odredili su referentne vrijednosti za *ttMA* u mokraći opće populacije na uzorku od 376 ispitanika uporabom metode HPLC-UV.<sup>20</sup> Maseni udio *ttMA* bio je u rasponu 15 – 163  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina. U nepušača je određen prosječni maseni udio od 41  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina, u pušača 70  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina, te u muških nepušača 37  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina i u ženskih nepušača 45  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina. Autori su zaključili da pušenje cigareta i spol znatno utječu na razinu *ttMA* u mokraći, za razliku od ostalih čimbenika, kao što su okolišni uvjeti, genetika, izloženost preko kože ili udisanjem i drugo.

### 2.5. Analitičke tehnike za određivanje koncentracije *S-PMA* u mokraći

*S-PMA* se izdvaja iz složene matrice biološkog uzorka ekstrakcijom organskim otapalom ili uporabom čvrstog nosača. Identifikacija i kvantifikacija željenog analita provodi se kromatografskim tehnikama uz odgovarajući detektor. Volumen uzorka mokraće koji se rabi za analizu u rasponu je od 0,5 mL do 10 mL.<sup>6,7,22,23,25</sup>

Za pretvorbu pre-*S-PMA* u *S-PMA* najčešće se rabi koncentrirana klorovodična kiselina.<sup>1,6,7,20,23</sup>

Što se tiče vrste ekstrakcije, u istraživanjima je najviše korištena tekućinska ekstrakcija (engl. *Liquid Extraction*, LE) s etil-acetatom kao otapalom.<sup>6,7,20,22,23</sup> Nedostatak ekstrakcije otapalom je mogućnost zaostajanja vode u organskom ekstraktu koja može izazvati razgradnju nepokretne faze plinskokromatografske kolone i hidrolizu sredstava za silanizaciju analita.<sup>6</sup> Voda se može odstraniti dodavanjem bezvodnog natrijevog sulfata u ekstrakt.<sup>19,23</sup> Rjeđe se rabi ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE).<sup>26,27</sup> Prednosti ove ekstrakcijske tehnike su učinkovitije izdvajanje analita i pročišćavanje uzorka, dok su nedostaci manja preciznost, dugotrajnost i relativno visoka cijena kolona sa sorbensom. Dugheri i sur.<sup>28</sup> proveli su mikroekstrakciju *S-PMA* na čvrstoj fazi uz uranjanje vlakna sa sorbensom u uzorak mokraće (engl. *Direct Immersion-Solid Phase Microextraction*, DI-SPME). Glavne prednosti ove metode su brzina izvođenja i nekorištenje organskog otapala.

Najčešće instrumentne tehnike koje su se rabile za identifikaciju i kvantifikaciju *S-PMA* u mokraći su GC-MS<sup>6,7,20,22,23,25</sup> i HPLC-MS.<sup>19,26,27</sup>



Glavni nedostatak metode HPLC s UV ili fluorescentnom detekcijom je nemogućnost nedvojbene identifikacije analita jer se zasniva samo na usporedbi vremena zadržavanja spoja u nepoznatom uzorku s vremenom zadržavanja spoja analitičkog standarda. Osim toga, fluorescentna detekcija zahtijeva derivatizaciju s *o*-ftalaldehidom/merkaptetanolom ili monobromobimananom nakon hidrolize.<sup>13</sup> Plinskokromatografske metode zahtijevaju metiliranje ili trimetilsililiranje prije detekcije, a tekućinskromatografske metode omogućuju direktnu analizu *S*-PMA bez prethodnog derivatiziranja. Detekcija metodom MS omogućava nedvojbenu identifikaciju analita jer daje informacije o strukturi spoja.<sup>13</sup> Od imunokemijskih metoda najčešće se rabi enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) koja omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratko vrijeme uz dobru osjetljivost i nisku cijenu. Nedostatak je manjak specifičnosti zbog križne reakcije antitijela te se stoga koncentracije blizu bioloških graničnih vrijednosti moraju dodatno potvrditi nekom instrumentnom metodom koja uključuje nedvojbenu identifikaciju analita.<sup>7</sup>

#### 2.5.1. GC-MS

Kako bi se plinski kromatograf povezao sa spektrometrom masa, analit je potrebno iz plinskokromatografske kolone prevesti u vakuum spektrometra masa ( $10^{-2} - 10^{-7}$  Torr). S obzirom na to da kapilarne plinskokromatografske kolone imaju dovoljno mali protok plina ( $0,5 - 1 \text{ mL min}^{-1}$ ), moguće je izravno uvođenje plina nosioca u ionizacijsku komoru bez narušavanja vakuuma u spektrometru masa. Nakon razdvajanja analita na kromatografskoj koloni dolazi do ionizacije ispitivane molekule u ionskom izvoru MS-a te potom i razdvajanja fragmenata na osnovi njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) u analizatoru koji potom u detektoru daju informacije o strukturi molekule. Spektrometar masa kao detektor može se koristiti na način da se mjeri ukupna ionska struja (engl. *Total Ion Current*, TIC) pri čemu se detektiraju svi ioni koji nastaju ionizacijom spojeva izeluiranih iz kromatografske kolone kao funkcija vremena, a može se koristiti i na način da se mjere intenziteti odabranih iona karakterističnih za pojedini spoj ili klasu spojeva kao funkcija vremena (tada je poboljšana osjetljivost i selektivnost). Najčešće korišteni plinskokromatografski detektori koji rade na principu spektrometrije masa su detektor selektivan za mase s kvadrupolnim analizatorom masa (engl. *Mass Selective Detector*, MSD) i detektor stupica iona (engl. *Ion Trap Detector*, ITD).

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

Tijekom pripreme uzoraka za analizu korištene kemikalije su analitički standardi *S*-PMA ( $\geq 98,0$  % Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i *S*-PMA-d5 (TRC, Toronto, Kanada), metanolna otopina klorovodične kiseline ( $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), klorovodična kiselina (min. 36,5 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev sulfat (bezvodni, *p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev hidroksid, kreatinin i pikrinska kiselina (*p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska), etil-acetat, acetonitril i metanol (čistoće za LC, Merck, Darmstadt, Njemačka), *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA) + 1 % trimetilklorsilan (TMCS) i *N*-mono(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (MSTFA) + 1 % TMCS (Restek, Bellefonte, PA, SAD).

Milli-Q-voda (deionizirana voda) pripravljena je pročišćavanjem destilirane vode pomoću sustava Millipore (Bedford, SAD).

### 3.2. Priprava standardnih otopina

Osnovna standardna otopina *S*-PMA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem 10 mg *S*-PMA u metanolu. Radna standardna otopina *S*-PMA ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) pripravljena je razrjeđivanjem osnovne otopine s metanolom.

Osnovna standardna otopina *S*-PMA-d6 (unutarnji standard, IS) ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) pripravljena je otapanjem 1 mg *S*-PMA-d6 u metanolu. Radna standardna otopina IS-a ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) pripravljena je razrjeđivanjem osnovne otopine s metanolom.

Sve otopine standarda pohranjene su na  $-20$  °C i bile su stabilne tijekom 3 mjeseca.

Za izradu baždarne krivulje za validaciju pripravljeno je osam standardnih otopina u rasponu koncentracija  $0,5 - 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  razrjeđivanjem radnog standarda s metanolom. Nakon toga, u 1 mL slijepog uzorka mokraće (uzorak u kojem nije detektirana *S*-PMA) dodano je po 40  $\mu\text{L}$  tako pripravljene otopine i po 10  $\mu\text{L}$  radne otopine IS. Masena koncentracija IS-a u uzorcima za izradu baždarne krivulje bila je  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Za izradu baždarne krivulje za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći ispitanika pripravljeno je šest standardnih otopina u rasponu koncentracija  $0,5 - 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Masena koncentracija IS-a u uzorcima za izradu ove baždarne krivulje i uzorcima mokraćne ispitanika bila je  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3. Instrumentacija i pribor

Za eksperimentalni dio rada korišteni su UV-VIS spektrofotometar (Cary 50, Varian, Mulgrave, Australija), analitička vaga (Mettler AE 200, Mettler-Toledo, Columbus, SAD), centrifuga (Hettich Zentrifugen, Universal 320 R, Njemačka), vodena kupelj i termostat (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska), uparivač (Pierce, Rockford, SAD), miješalica (Vibromix, Tehtnica, Železniki, Slovenija), mikroštrcaljka od  $10 \mu\text{L}$  (Hamilton, Bonaduz, Švicarska), automatske pipete  $1 - 10 \mu\text{L}$ ,  $10 - 100 \mu\text{L}$ ,  $100 - 1000 \mu\text{L}$  i  $1000 - 5000 \mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te odmjerne tikvice od  $10 \text{ mL}$  (Schott Boral, Pula, Hrvatska).

Uzorci su analizirani uporabom plinskog kromatografa Trace 1300 (Thermo Scientific, Milano, Italija) spregnutog sa spektrometrom masa ITQ 700 (Thermo Scientific, Austin, TX, SAD) kod kojeg je detektor ionska stupica. Unutar pećnice instrumenta nalazila se kapilarna kolona TG-5MS duljine  $30 \text{ m}$  i unutarnjeg promjera  $0,25 \text{ mm}$ . Kao nepokretna faza poslužio je  $5 \%$ -tni fenil- i  $95 \%$ -tni metil-polisiloksan debljine sloja  $0,25 \mu\text{m}$  proizvođača tvrtke Thermo Scientific (Runcorn, UK). Kao pokretna faza rabljen je helij stupnja čistoće  $6.0 (>99,9999 \%)$  uz protok od  $1 \text{ mL/min}$ .

### 3.4. Ispitanici

Istraživanje je provedeno nad uzorcima mokraćne  $20$  ispitanika, zaposlenika Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu dobnog raspona od  $29$  do  $65$  godina. Uzorci mokraćne ( $10 - 20 \text{ mL}$ ) prikupljeni su u plastične posude na kraju radne smjene i analizirani u roku od  $24$  sata od sakupljanja.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Prije prikupljanja uzoraka mokraćne, ispitanici su upoznati usmenim i pismenim putem sa svrhom istraživanja koje je provedeno u skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije. Nakon potpisivanja informiranog pristanka na sudjelovanje u istraživanju u sklopu diplomskog rada, ispitanici su ispunili priloženi upitnik o navikama pušenja i izloženosti benzenu (Prilog).

### 3.5. Ekstrakcija *S*-PMA iz uzoraka mokraće

U staklenoj epruveti s brušenim čepom promiješan je 1 mL mokraće, 50  $\mu\text{L}$  klorovodične kiseline i 10  $\mu\text{L}$  IS-a (masena koncentracija IS-a u uzorku: 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Nakon dodavanja 4 mL etil-acetata, svaki uzorak je promiješan na miješalici 1 minutu i centrifugiran 10 minuta na 976 g pri sobnoj temperaturi. Po završetku centrifuge, odijelio se gornji organski sloj. Odijeljeni sadržaj potom se stavio na uparavanje u struji dušika u vodenoj kupelji pri 40 °C. Na suhi ostatak dodalo se sredstvo za derivatizaciju (1 mL 1,25 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl/CH<sub>3</sub>OH). Nakon zagrijavanja 15 minuta pri 50 °C, derivatizirani uzorak se ponovno stavio na uparavanje u struji dušika u vodenoj kupelji pri 40 °C, a na dobiveni suhi ekstrakt dodalo se 100  $\mu\text{L}$  etil-acetata.

### 3.6. Plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Uzorak dobiven nakon ekstrakcije otapalom idućeg je dana unešen u plinskokromatografski injektor. U injektor se unosio 1  $\mu\text{L}$  uzorka.

Temperatura injektora bila je 250 °C, a temperatura međuspoja 280 °C. Temperatura kolone od 50 °C održavana je 1 min te je povišena na 170 °C, zagrijavanjem od 20 °C/min. Nakon toga, kolona je zagrijana na 290 °C, porastom od 50 °C/min. Na konačnoj temperaturi kolona je ostala 0,15 min. Temperatura ionskog izvora bila je 200 °C. Spektri masa snimani su u rasponu  $m/z$  50 – 300. Ionizacija je provedena elektronima pri energiji od 70 eV. Praćeni su ioni metiliranog analita:  $m/z$  194 i 253 za *S*-PMA i  $m/z$  199 i 258 za *S*-PMA-d<sub>6</sub>. Za kvantifikaciju su se rabili ioni  $m/z$  194 za *S*-PMA i  $m/z$  199 za *S*-PMA-d<sub>6</sub>.

*S*-PMA je identificirana usporedbom vremena zadržavanja analita u plinskokromatografskoj koloni u nepoznatom uzorku i vremena zadržavanja analitičkog standarda te usporedbom dobivenog spektra masa ispitivanog analita sa spektrom masa u komercijalno dostupnoj bazi spektara masa NIST13. Za kvantitativno određivanje analita korištena je metoda unutarnjeg standarda.

### 3.7. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije *S*-PMA

Optimiziranje uvjeta ekstrakcije provedeno je na uzorku mokraće koji je pripremljen tako da je masena koncentracija *S*-PMA iznosila 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Kako bi se ispitale interferencije,

uvijek je pripremljen i slijepi uzorak mokraćne koji nije sadržavao *S*-PMA i prolazio je isti postupak kao i uzorak sa standardom. Učinkovitost različitih uvjeta ekstrakcije ispitana je uspoređivanjem površina ispod pika analita u ionskom kromatogramu. Najveća površina pika odgovarala je najučinkovitijoj ekstrakciji. Sve su analize provedene u triplikatu.

Slijedeći literaturne navode,<sup>5,22</sup> početni uvjeti za ekstrakciju uključivali su 1 mL urina koji je pomiješan s 50  $\mu$ L klorovodične kiseline, ekstrahiran s 4 mL etil-acetata, centrifugiran 10 minuta pri 976 g, odijeljen organski ekstrakt uparen je do suha u struji dušika u vodenoj kupelji na 40 °C, otopljen u metanolnoj otopini klorovodične kiseline, derivatiziran 15 minuta na 50 °C, uparen do suha u struji dušika u vodenoj kupelji na 40 °C te otopljen u 100  $\mu$ L diklorometana.

### 3.7.1. Ispitivanje sredstava za derivatizaciju, uz dodatak bezvodnog natrijevog sulfata i bez njegovog dodatka

Sredstva za derivatizaciju koja su se ispitala su *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA) + 1% trimetilklorosilan (TMCS), *N*-mono(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (MSTFA) i klorovodična kiselina (1,25 mol dm<sup>-3</sup>) u metanolu (1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH). Proveden je postupak kao što je opisano u poglavlju 3.7. s razlikom da se u odijeljeni organski ekstrakt nakon centrifuge dodala 1 žličica (oko 1 g) bezvodnog natrijevog sulfata. Napravljen je uzorak kod kojih se preskočio postupak dodavanja bezvodne soli. Odijeljeni sadržaj potom se stavio na uparavanje u struji dušika u vodenoj kupelji pri 40 °C. Nakon toga, dodalo se određeno sredstvo za derivatizaciju (50  $\mu$ L BSTFA + 1 % TMCS, 50  $\mu$ L MSTFA + 1 % TMCS, odnosno 1 mL 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH). U slučaju BSTFA i MSTFA, uzorak se nakon derivatizacije u trajanju od 30 minuta pri 70 °C mogao odmah rabiti za analizu GC–MS-om. Međutim, u slučaju 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH, nakon derivatizacije u trajanju od 15 minuta pri 50 °C, prije samog nanošenja uzorka na kolonu plinskog kromatografa, uzorak se morao još jednom upariti u struji dušika u vodenoj kupelji pri 40 °C, nakon čega se na suhi ekstrakt dodalo otapalo (diklorometan).

### 3.7.2. Ispitivanje pH-vrijednosti dodatkom klorovodične kiseline

Kod pripreme uzorka, koja je opisana u poglavlju 3.7. ispitala su se tri volumena klorovodične kiseline (50, 100 i 200  $\mu$ L) za učinkovitu pretvorbu pre-*S*-PMA u *S*-PMA u uzorku mokraćne volumena 1 mL. Pomoću univerzalnog indikatorskog papira ispitala se pH-vrijednost uzorka.

### 3.7.3. Ispitivanje vrste otapala za ekstrakciju S-PMA

Otapala koja su se ispitivala za ekstrakciju su etil-acetat i acetonitril. Postupak ekstrakcije opisan je u poglavlju 3.7. Osim različitog volumena otapala (4 mL etil-acetata i 1 mL acetonitrila za ekstrakciju S-PMA iz 1 mL mokraće), ekstrakcija acetonitriplom je, prije odvajanja gornjeg sloja, uključivala i pohranu uzorka pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  preko noći. Daljnji postupak, nakon odvajanja tekućeg organskog dijela od zamrznutog vodenog dijela, bio je isti kao za etil-acetat.

### 3.7.4. Ispitivanje volumena mokraće

U poglavlju 3.7. opisana je priprema uzorka s 1 mL urina, međutim, htjeli smo ispitati utjecaj volumena mokraće na učinkovitost ekstrakcije pa je ekstrakcija provedena i s 2 mL mokraće.

### 3.7.5. Ispitivanje otapala za suhi ekstrakt

Nakon derivatizacije s  $1,25\text{ mol dm}^{-3}$  HCl/CH<sub>3</sub>OH, uzorci su se još jednom uparili u struji dušika u vodenoj kupelji pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga, dobio se suhi ekstrakt u koji se dodalo 100  $\mu\text{L}$  otapala. Otapala za suhi ekstrakt koja smo ispitivali su etil-acetat i diklormetan.

### 3.7.6. Ispitivanje uvjeta derivatizacije

Uvjeti derivatizacije s  $1,25\text{ mol dm}^{-3}$  HCl/CH<sub>3</sub>OH koji su se ispitivali su volumen sredstva (1 i 2 mL), temperatura pri kojoj se odvija derivatizacija i vrijeme potrebno za završetak kemijske reakcije. Provela se derivatizacija pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 15 i 30 minuta te pri sobnoj temperaturi ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od 15 i 30 minuta.

## 3.8. Određivanje masene koncentracije kreatinina u mokraći

U svakog ispitanika određena je masena koncentracija kreatinina u mokraći standardnom spektrofotometrijskom metodom po Jaffeu.<sup>29</sup> U 2 mL pikrinske kiseline (0,26 %) dodano je 20  $\mu\text{L}$  mokraće ispitanika i 2 mL  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  natrijevog hidroksida. Slijepi uzorak pripremljen je na isti način, ali bez mokraće. Standard je pripremljen tako da je umjesto mokraće dodano 20  $\mu\text{L}$  standarda kreatinina (0,1 %). Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu. U slijepom

uzorku, standardu i uzorcima mokraće ispitanika izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini  $\lambda=492$  nm.

### 3.9. Validacija

Validacija analitičke metode je proces utvrđivanja prikladnosti metoda za uporabu u određenu svrhu.

Granica detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) je najmanja količina analita koja se može odrediti, a koja se računa na način da se masena koncentracija u uzorku na niskoj koncentracijskoj razini pomnoži s 3 i podijeli s omjerom signala i šuma u tom uzorku (engl. *Ratio Signal to Noise*, S/N):

$$\text{LOD} = \frac{\text{masena koncentracija} \times 3}{\frac{S}{N}}.$$

Granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) je najmanja količina analita koja se može mjeriti, a koja se računa na način da se masena koncentracija u uzorku na niskoj koncentracijskoj razini pomnožena s 10 podijeli s omjerom signala i šuma:

$$\text{LOQ} = \frac{\text{masena koncentracija} \times 10}{\frac{S}{N}}.$$

Preciznost mjerenja predstavlja bliskost mjerenja pri istim uvjetima, a dobiva se na način da se standardno odstupanje (engl. *Standard Deviation*, SD) podijeli s aritmetičkom sredinom (engl. *Average*, AVG) i pomnoži sa 100 %. dobiveni rezultat predstavlja relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD):

$$\text{RSD} = \frac{SD}{AVG} \times 100 \%.$$

U ovom se istraživanju mjerenje preciznosti provodilo na šest replikata uzorka standarda koncentracije  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  i na šest replikata uzorka standarda koncentracije  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Točnost mjerenja predstavlja odstupanje dobivenog rezultata mjerenja od teorijske vrijednosti. Računa se na sljedeći način:

$$\text{točnost} = \frac{AVG}{\text{teorijska vrijednost}} \times 100 \%.$$

Linearnost metode predstavlja ovisnost između dvije varijable koja se može prikazati jednadžbom pravca u kojoj porastom vrijednosti jedne varijable, dolazi do promjene vrijednosti druge varijable. U sklopu ovog istraživanja, linearnost je ispitana u rasponu koncentracija  $0,5 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **3.10. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada rezultata provedena je primjenom programa STATISTICA for Windows verzija 13,2 (StatSoft Inc., SAD). Zbog nesimetrične raspodjele mjerenih parametara, rezultati unutar grupa izraženi su kao medijan i raspon, a za ocjenu značajnosti razlike između pojedinih grupa primijenjen je Mann-Whitneyev  $U$ -test. Za prag statističke značajnosti određen je  $p < 0,05$ .



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Mokraća je najčešće korišteni biološki uzorak za procjenu izloženosti benzenu budući da je lako dostupan, proces sakupljanja nije invazivan (za razliku od npr. uzorkovanja krvi) i može se prikupiti u dovoljnim količinama.<sup>9</sup>

U ovom radu optimizirani su uvjeti ekstrakcije i derivatizacije *S*-PMA iz mokraće uz detekciju i kvantifikaciju analita GC-MS-om te je validirana metoda korištena za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći nepušača i pušača. Naime, dosad objavljene metode za analizu *S*-PMA u mokraći primjenom GC-MS-a nisu uključivale optimiziranje uvjeta ekstrakcije otapalom s ciljem postizanja što većeg analitičkog povrata *S*-PMA.<sup>5-7,22</sup>

### 4.1. Optimiziranje uvjeta derivatizacije *S*-PMA

Derivatizaciju je potrebno provesti kako bi se *S*-PMA prevela u nepolarniji oblik i na taj način dulje zadržavala u nepokretnoj polidimetilsiloksanskoj fazi kapilarne kolone plinskog kromatografa. Derivatizacijom se također postiže povećanje hlapljivosti i termostabilnosti spoja što su osnovni uvjeti za plinskokromatografsku analizu.

#### 4.1.1. Izbor sredstva za derivatizaciju *S*-PMA uz dodatak natrijevog sulfata ili bez njegovog dodatka

Sredstva za derivatizaciju *S*-PMA koja su se u literaturi najviše rabila su HCl/CH<sub>3</sub>OH<sup>5-7,22</sup> i BSTFA.<sup>1,23</sup> U sklopu istraživanja ispitala su se 3 reagensa za derivatizaciju: BSTFA i MSTFA uz dodatak 1 % TMCS koji je katalizator te 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH. MSTFA ima prednost nad BSTFA jer je manje korozivan te stoga ne oštećuje nepokretnu fazu. Utvrđeno je da je najpogodnije sredstvo za derivatizaciju 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH s obzirom na to da su prilikom derivatizacije s BSTFA i MSTFA kromatografski pikovi znatno razvučeniji i manjih površina u odnosu na pikove koji su se dobili uporabom 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH. Osim toga, šum bazne linije kromatograma bio je znatno veći prilikom silanizacije, nego prilikom metiliranja. Razlog loše kvalitete pikova može biti zaostatak vode u organskom ekstraktu koja dovodi do hidrolize silaniziranog derivata.

Kako bi se uklonila eventualno zaostala voda u organskom sloju nakon ekstrakcije, u uzorak je dodan bezvodni natrijev sulfat. Površina pika silaniziranog analita se povećala oko 20 %, ali su najuži pikovi s najvećom površinom te kromatogram s najmanjim šumom bazne linije dobiveni metiliranjem bez dodatka soli. Budući da je natrijev sulfat vezao oko 10 % metiliranog analita, zaključilo se da je metiliranje najučinkovitije kad se u odvojeni gornji sloj nakon centrifugiranja ne dodaje sol.

#### 4.1.2. Optimiziranje uvjeta derivatizacije

Sljedeći literaturne navode, ispitani su temperatura i vrijeme derivatizacije te volumen metilirajućeg sredstva.<sup>5-7,22</sup> U ovom je pokusu korišten uzorak s masenom koncentracijom *S*-PMA od 100 µg L<sup>-1</sup> što je, prema procjeni, najveća koncentracija koju se očekuje kod profesionalne izloženosti benzenu. Derivatizacija uzorka s 1 i 2 mL sredstva provodila se 15 i 30 minuta pri sobnoj temperaturi od 22 °C i pri 50 °C. Oko 15 % veća površina pika dobivena je nakon derivatizacije pri 50 °C, bez obzira na vrijeme trajanja postupka. Radi uštede vremena, u daljnjim je pokusima korištena derivatizacija od 15 minuta pri 50 °C.

## 4.2. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije *S*-PMA iz mokraće

Ekstrakciju uzorka urina potrebno je provesti kako bi se *S*-PMA iz mokraće odvojila od ostalih metabolita prisutnih u urinu. Ispitali su se sljedeći parametri: optimalni pH mokraće za ekstrakciju, vrsta otapala za ekstrakciju, volumen mokraće i najpogodnije otapalo za suhi ostatak nakon uparavanja ekstrakta.

#### 4.2.1. Zakiseljavanje uzorka klorovodičnom kiselinom

Zakiseljavanje uzorka mokraće potrebno je provesti kako bi se pre-*S*-PMA pretvorila u *S*-PMA. Za tu svrhu koristila se 36,5 %-tna klorovodična kiselina i na taj način pH-vrijednost urina snizila sa 6 – 8 na 2. Ispitana su 3 različita volumena klorovodične kiseline (50, 100 i 200 µL). Volumen kiseline nije utjecao na učinkovitost ekstrakcije te je zaključeno da je dovoljno radi uštede dodati 50 µL klorovodične kiseline.

#### 4.2.2. Izbor otapala za ekstrakciju

Kao sredstvo za ekstrakciju *S*-PMA najčešće se rabi etil-acetat.<sup>5-7,22,23</sup> U jednom je istraživanju provedena ekstrakcija acetonitrilom<sup>1</sup> te smo stoga ispitali oba otapala. Slijedeći literaturne nalaze volumen etil-acetata koji se dodao prilikom pripreme uzorka je 4 mL, a acetonitrila 1 mL na 1 mL uzorka mokraće. Etil-acetat se pokazao boljim izborom kao sredstvo za ekstrakciju u odnosu na acetonitril, što se vidjelo na užim i znatno većim (oko 30 %) kromatografskim pikovima u kromatogramu.

#### 4.2.3. Optimiziranje volumena mokraće za ekstrakciju

S ciljem povećanja osjetljivosti metode, ispitao se volumen uzorka mokraće za ekstrakciju (1 i 2 mL) uz uporabu 4 mL etil-acetata. Omjer mokraće i etil-acetata 1:4 pokazao se kao bolji jer je dao uže pikove uz manji šum bazne linije kromatograma. Naime, pri manjem omjeru mokraće i etil-acetata (1:2), bilo je teško izdvojiti organski dio ekstrakta bez da se povuče dio sluzi na granici slojeva koja je znatno narušavala kvalitetu kromatograma. Omjer 1:4 korišten je i u većini drugih istraživanja.<sup>5,7,22</sup>

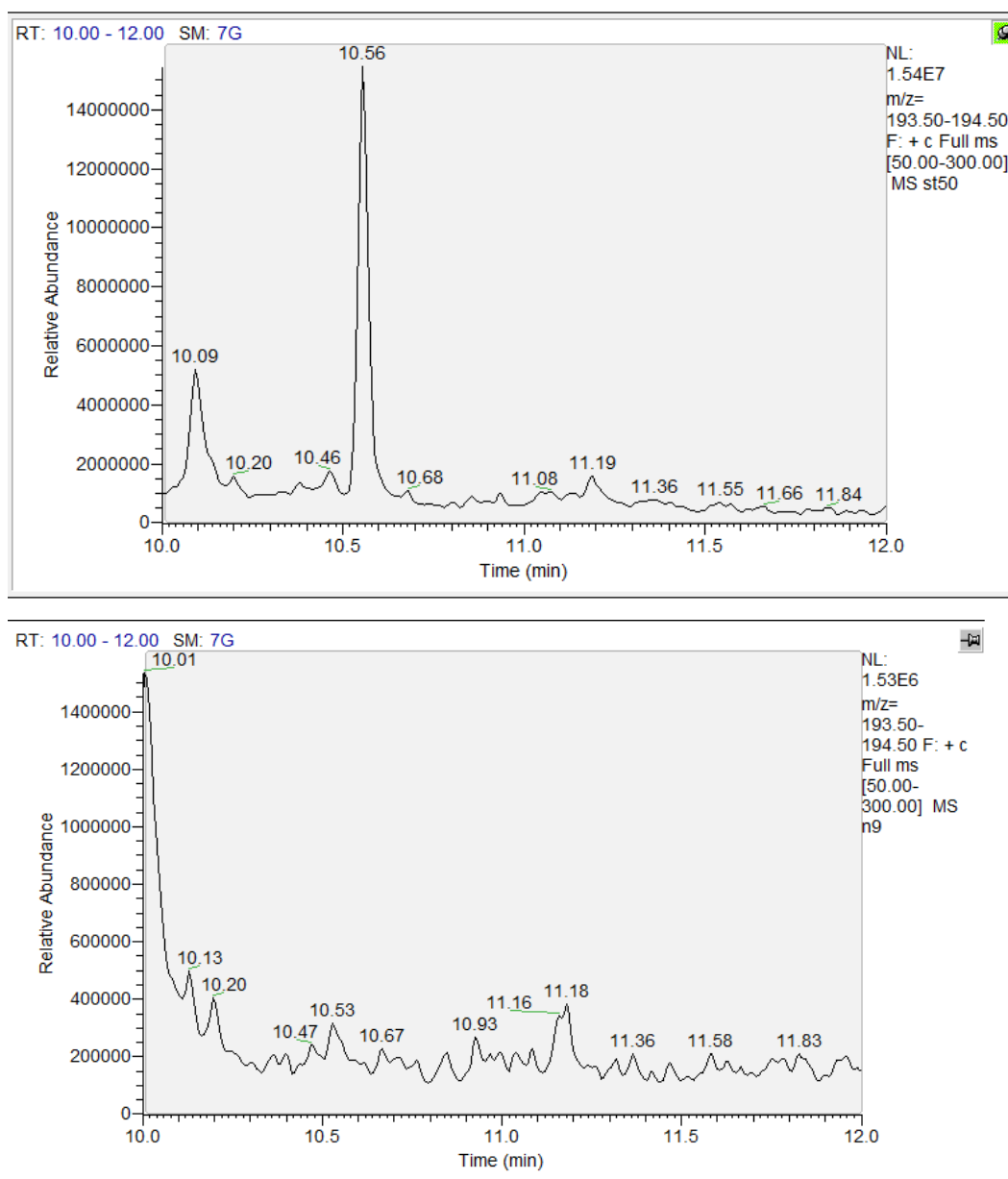
#### 4.2.4. Izbor otapala za suhi ekstrakt

Suhi ekstrakt, dobiven nakon uparavanja uzorka, koji se derivatizirao s 1,25 mol dm<sup>-3</sup> HCl/CH<sub>3</sub>OH, u struji dušika pri 40 °C, otopio se u 100 µL diklormetana, odnosno u 100 µL etil-acetata. Etil-acetat pokazao se prikladnijim otapalom s obzirom na to da ima više vrelište u odnosu na diklormetan (77,1 °C u odnosu na 39,6 °C), što je onda pogodnije za analizu metodom GC-MS. Naime, početna temperatura kapilarne kolone obično je 20 °C niža od vrelišta otapala kako bi se fokusiranjem na koloni postigli uski i simetrični pikovi koji se mogu lako integrirati pri izračunavanju površine pika. Uporabom etil-acetata početna temperatura kolone bila je niža od vrelišta etil-acetata za 20 °C i iznosila je 50 °C, što je znatno smanjilo trajanje analize u usporedbi s uporabom diklormetana kad je početna temperatura kolone bila niža (35 °C). Višom početnom temperaturom se znatno smanjilo i vrijeme potrebno za postizanje početnih temperaturnih uvjeta kolone za sljedeću analizu.

### 4.3. Rezultati validacije analitičke metode

Analiza *S*-PMA u mokraći provedena je uz primjenu uvjeta ekstrakcije opisanih u poglavlju 3.5 i kromatografskih uvjeta opisanih u poglavlju 3.6.

Slika 4. prikazuje ionske kromatograme uzorka mokraće u koji je dodana *S*-PMA u koncentraciji od  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  i ispitanika s koncentracijom *S*-PMA od  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .



Slika 4. Ionski kromatogrami uzorka mokraće u koji je dodana *S*-PMA u koncentraciji od  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (gornja slika) i ispitanika s koncentracijom *S*-PMA od  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  (donja slika).

Optimizirani uvjeti ekstrakcije i analize omogućili su učinkovito razdvajanje ispitivanog analita od ostalih prisutnih sastojaka. Na mjestu zadržavanja analita u kromatogramu nisu bile prisutne interferencije, a šum bazne linije bio je nizak. S ciljem izbjegavanja pojava dodatnih pikova pri većim temperaturama kolone zbog nečistoća prisutnih u složenoj matrici uzorka, nakon programiranog zagrijavanja do 290 °C kolona je ostala na toj temperaturi još 0,15 min.

Baždarna krivulja izrađena je u rasponu od 0,5 – 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  s koeficijentom ( $R^2$ ) > 0,9996 što upućuje na linearnost odziva detektora u ispitivanom koncentracijskom području.

Postignute granice detekcije (0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) i kvantifikacije (0,09  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) usporedive su s literaturnim vrijednostima dobivenim metodom GC-MS uz ekstrakciju DI-SPME<sup>22</sup> te uporabom metode HPLC-MS uz ekstrakciju otapalom<sup>19</sup> i SPE.<sup>27</sup> Validirana metoda znatno je osjetljivija od prethodno objavljenih metoda uz uporabu GC-MS-a i ekstrakciju etil-acetatom kod kojih je postignuta granica detekcije bila u rasponu 1 – 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>6,7,22,23</sup>

Tablica 1. prikazuje rezultate određivanja preciznosti i točnosti metode za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći.

Tablica 1. Preciznost i točnost pri određivanju masene koncentracije *S*-fenilmerkapturane kiseline (*S*-PMA) u mokraći ( $n = 6$ ).

Analit	$\gamma$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Preciznost (RSD %)	Točnost (%)
<i>S</i> -PMA	10	6,4	95,5
	80	3,1	98,0

RSD – relativno standardno odstupanje

Preciznost, izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD), bila je < 7 % što upućuje na dobru preciznost mjerenja i u skladu je s prethodno objavljenim vrijednostima.<sup>6,7,22,23</sup>

Točnost veća od 95 % za obje ispitivane koncentracijske razine bila je bolja u usporedbi s točnosti prethodno objavljenih metoda koje su bile veće od 80 %.<sup>7,22</sup>

#### 4.4. Određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći ispitanika

Predložena metoda primijenjena je za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći 20 ispitanika u dobi od 29 do 65 godina koji nisu bili profesionalno izloženi benzenu

i koji stanuju u različitim dijelovima grada Zagreba. Među njima je bilo 10 nepušača i 10 pušača, koji su pušili 2 do 20 cigareta dnevno. Rezultati analize su korigirani s obzirom na sadržaj kreatinina što je propisano Pravilnikom o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima (NN 91/2018).

Raspon i medijan masenih koncentracija *S*-PMA u mokraći ispitanika te značajnost razlike u koncentraciji među grupama prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Raspon i medijan masenih koncentracija *S*-PMA u mokraći ispitanika te značajnost razlike u koncentraciji među grupama.

Ispitanici	Medijan ( $\gamma / \mu\text{g g}^{-1}$ kreatinina)	Raspon ( $\gamma / \mu\text{g g}^{-1}$ kreatinina)	Mann-Whitneyjev <i>U</i> -test
Nepušači ( $N = 10$ )	0,2	0,1 – 2,3	$p = 0,014$
Pušači ( $N = 10$ )	0,8	0,3 – 5,8	

U svim su uzorcima koncentracije bile iznad granice kvantifikacije.

Masena koncentracija *S*-PMA u mokraći pušača bila je značajno viša od koncentracije *S*-PMA u mokraći nepušača. Masene koncentracije u svim su uzorcima bile niže od  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  što je u skladu s masenim koncentracijama koje se očekuju u populaciji koja nije profesionalno izložena benzenu.<sup>2</sup>

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog istraživanja optimizirani su uvjeti ekstrakcije *S*-PMA iz mokraće te je razvijena i validirana metoda za kvantitativno određivanje ispitivanog analita vezanim sustavom GC-MS. Volumen uzorka, vrsta i volumen otapala za ekstrakciju te uvjeti derivatizacije analita imali su značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije analita iz uzorka mokraće. Metoda je upotrijebljena za određivanje masene koncentracije *S*-PMA u mokraći 20 ispitanika koji nisu bili profesionalno izloženi benzenu. Utvrđeno je da su pušači imali značajno višu koncentraciju *S*-PMA u mokraći u usporedbi s nepušačima. Razvijena metoda je brza, osjetljiva, precizna i točna te se njenom primjenom omogućuje uspješna procjena izloženosti benzenu iz okoliša kao i na radnom mjestu.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. I. C. Costa-Amaral, L. V. B. Carvalho, M. V. C. Santos, D. Valente, A. C. Pereira, V. O. Figueiredo, J. Mendonça de Souza, V. S. Castro, M. de Fátima Trancoso, A. S. A. Fonseca, V. G. Milagres, M. P. R. Mendes, M. J. N. Paiva, L. C. André, R. M. Borges, M. A. C. Menezes, S. R. Alves, E. S. Gonçalves, H. A. Sisenando, J. A. Perini, M. S. Oliveira, M. J. Moura-Correa, L. R. Teixeira, A. R. Collins, R. de Cássia O. C. Mattos, P. N. Sarcinelli, A. L. Larentis, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16** (2019) 2240
2. C. P. Weisel, *Chem. Biol. Interact.* **184** (2010) 58 – 66
3. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Benzene*. Lyon, France: IARC, Vol. 120.
4. C. A. Haiman, Y. M. Patel, D. O. Stram, S. G. Carmella, M. Chen, L. R. Wilkens, L. Le Marchand, S. S. Hecht, *PLoS One* **11(3)** (2016) 1 – 15
5. M. Sørensen, H. Skov, H. Autrup, O. Hertel, S. Loft, *Sci. Total Environ.* **309** (2003) 69 – 80
6. J. Angerer, M. Schildbach, A. Krämer, *J. Anal. Toxicol.* **22** (1998) 211 – 214
7. G. Marrubini, E. Terulla, G. Brusotti, G. Massolini, *J. Chromatogr. B* **822** (2005) 209 – 220
8. *Background document to RAC opinion on benzene*, European Chemicals Agency (ECHA), Helsinki, 2018.
9. A. J. Li, V. K. Pal, K. Kannan, *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* **3** (2021) 91 – 116
10. K. Sterz, D. Köhler, T. Schettgen, G. Scherer, *J. Chromatogr. B* **878** (2010) 2502 – 2505
11. S. M. Hays, D. W. Pyatt, C. R. Kirman, L. L. Aylward, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **62** (2012) 62 – 73
12. *Updating and Revision of the Air Quality Guidelines for Europe*, Report on the WHO Working Group on Volatile Organic Compounds, 1996
13. P. B. Farmer, B. Kaur, J. Roach, L. Levy, D. Consonni, P. A. Bertazzi, A. Pesatori, S. Fustinoni, M. Buratti, M. Bonzini, A. Colombi, T. Popov, D. Cavallo, A. Desideri, F. Valerio, M. Pala, C. Bolognesi, F. Merlo, *Chem. Biol. Interact* **153–154** (2005) 97 – 102
14. J. L. Moran, D. Siegel, D. Ross, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (1996) 8150 – 8155



15. M. Campagna, G. Satta, L. Campo, V. Flore, A. Ibba, M. Meloni, M. G. Tocco, G. Avataneo, C. Flore, S. Fustinoni, P. Cocco, *Med. Lav.* **103** (2012) 338 – 346
16. *Biological Exposure Index (BEI) review*, Worksafe, Wellington, 2020.
17. P. J. Boogaard, N. J. van Sittert, *Occup. Environ. Med.* **52** (1995) 611 – 620
18. S. Ghittori, M. Imbriani, L. Maestri, E. Capodaglio, A. Cavalleri, *Toxicol. Lett.* **108** (1999) 329 – 334.
19. O. Inoue, E. Kanno, M. Kakizaki, T. Watanabe, K. Higashikawa, M. Ikeda, *Ind. Health.* **38** (2000) 195 – 204.
20. P. J. Boogaard, N. J. van Sittert, *Environ. Health Perspect.* **104** (6) (1996) 1151 – 1157.
21. A. A. Melikian, Q. Qu, R. Shore, G. Li, H. Li, X. Jin, B. Cohen, L. Chen, Y. Li, S. Yin, R. Mu, X. Zhang, Y. Wang, *J. Chromatogr. B* **778** (2002) 211 – 221.
22. N. J. van Sittert, P. J. Boogaard, G. D. J. Beulink, *Br. J. Ind. Med.* **50** (1993) 460 – 469.
23. S. Waidyanatha, N. Rothman, G. Li, M. T. Smith, S. Yin, S. M. Rappaport, *Anal. Biochem.* **327** (2004) 184 – 199
24. C. Aprea, G. Sciarra, N. Bozzi, M. Pagliantini, A. Perico, P. Bavazzano, A. Leandri, M. Carrieri, M. L. Scapellato, M. Bettinelli, G. B. Bartolucci, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **55** (2008) 329 – 340
25. P. Stommel, G. Muller, W. Stucker, C. Verkoyen, S. Schobel, K. Norpoth, *Carcinogenesis* **10** (1989) 279 – 282
26. S. Feng, H. J. Roethig, Q. Liang, R. Kinser, Y. Jin, G. Scherer, M. Urban, J. Engl, K. Riedel, *Biomarkers* **11** (2006) 28 – 52.
27. G. Tranfo, G. B. Bartolucci, D. Pigni, E. Paci, M. L. Scapellato, D. Doria, M. Manno, M. Carrieri, *J. Chromatogr. B.* **878** (2010) 2529 – 2533.
28. S. Dugheri, N. Mucci, G. Cappelli, A. Bonari, M. Campagna, G. Arcangeli, G. Bartolucci, *J. Mass Spectrom.* (2019) 1 – 11.
29. B. Štraus, *Medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, str. 320, 1992.

## § 7. DODATAK

### INFORMIRANI PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU U SKLOPU DIPLOMSKOG RADA

NAZIV ISTRAŽIVANJA: „**Optimiziranje uvjeta analize S-fenilmerkapturne kiseline u mokraći primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa**“

MJESTO ISTRAŽIVANJA: **Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI), Zagreb**

IME I PREZIME VODITELJA ISTRAŽIVANJA (ispitivač i mentor): **doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, dipl. ing. med. biokem., ERT, v. znan. sur.**

IME I PREZIME DIPLOMANDA: **Doroteja Cindrić, univ. bacc. chem. (diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu)**

Poštovana/Poštovani,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u sklopu kojeg će se razviti metoda za detekciju S-fenilmerkapturne kiseline (S-PMA) mokraći. S-PMA se smatra specifičnim pokazateljem izloženosti benzenu kod opće populacije i pri profesionalnoj izloženosti. Ispitanicima se neće isplaćivati naknada za sudjelovanje u istraživanju.

Voditelj istraživanja i ispitivač je doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, dipl. ing. med. biokem. Istraživanje se provodi u svrhu izrade diplomskog rada i provest će se u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam u IMI-ju. Izvor financiranja su sredstva programskog financiranja javnih znanstvenih instituta koja je doznačilo Ministarstvo znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Molimo Vas da pažljivo pročitate ovaj Informirani pristanak na sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi i koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ukoliko pristanete na sudjelovanje.

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i može se u bilo kojem trenutku povući. Ukoliko odlučite sudjelovati u ovom istraživanju od Vas će se

tražiti da potpišete Informirani pristanak uz naznaku datuma. Informirani pristanak potpisuje i istraživač, a potpisanu presliku Informiranog pristanka dobit ćete osobno prije početka navedenog istraživanja. Original potpisanog Informiranog pristanka nalazi se kod istraživača ovog ispitivanja.

Istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

### **PODACI O ISTRAŽIVANJU**

Benzen je hlapljivi aromatski ugljikovodik koji se može nalaziti u otapalima u proizvodnji boja, premaza, gume, sredstava za odmašćivanje, u kemijskoj industriji i laboratorijima. Glavni okolišni izvori izloženosti benzenu su ispušni plinovi motornih vozila i duhanski dim. U organizam se unosi uglavnom udisanjem. Međunarodna agencija za istraživanje raka uvrstila je benzen u skupinu ljudskih kancerogena.

**S-fenilmerkaptorna kiselina (S-PMA)** u mokraći smatra se **specifičnim pokazateljem profesionalne izloženosti benzenu** te je stoga uvrštena u Pravilnik o zaštiti radnika od izloženosti opasnim kemikalijama na radu, graničnim vrijednostima izloženosti i biološkim graničnim vrijednostima (NN 91/2018). S-PMA u mokraći uzorkovanoj na kraju radne smjene smije iznositi do 46 µg/g kreatinina.

**Cilj ovog istraživanja** je optimizirati osjetljivu i specifičnu analitičku metodu za određivanje masene koncentracije S-PMA u mokraći primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS). Predloženom metodom odredit će se postoji li značajna razlika u masenoj koncentraciji S-PMA u mokraći nepušača ( $N=10$ ) i pušača ( $N=10$ ) s obzirom na to da je cigaretni dim jedan od glavnih izvora benzena u okolišu.

Procijenjeno trajanje istraživanja je 1 mjesec. Istraživanje se provodi na jednoj skupini odraslih ispitanika (18 – 65 godina), a postojat će samo jedan susret ispitanik-ispitivač i to u trenutku prikupljanja podataka upitnikom i preuzimanja uzorka mokraće.

Za potrebe istraživanja molimo Vas da potpišete Informirani pristanak i ispunite popratni upitnik.

Ispitivač će od Vas preuzeti uzorak urina (10 mL) koji ćete prikupiti u plastičnu posudu s čepom na kraju radne smjene i to uz poštivanje svih mjera za suzbijanje epidemije bolesti COVID-19 koje će u navedenom trenutku biti propisane od strane nadležnih tijela. U tom će se uzorku odrediti količina S-PMA te će se istražiti povezanost s izloženošću cigaretnom dimu.

### **MOGUĆI RIZICI I NEUGODNOSTI**

Ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik osim uobičajenog svakodnevnog rizika.

## **MOGUĆE KORISTI**

Ispitanici, kao niti ispitivač koji provodi ovo istraživanje neće imati izravnu medicinsku korist od sudjelovanja u ispitivanju.

## **POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA**

Svi uzorci bit će kodirani (brojem i slovima) za trajno osiguranje Vaše anonimnosti i privatnosti i pohranjeni u IMI-ju. Podaci se smiju rabiti samo u znanstvene svrhe (izrada diplomskog rada i objavljivanje znanstvenih radova), bez objave privatnih podataka (imena, prezimena, adresa, podaci o ispitaniku), a podaci za kontakt neće se objaviti i bit će zaštićeni u bazi podataka bez pristupa neovlaštenih osoba.

## **GDPR**

Ispitanici će biti upozoreni kako svojim potpisom ujedno potpisuju suglasnost za uporabu kodiranih podataka i mogućih ostataka kodiranih uzoraka za daljnja znanstvena istraživanja.

Prema zakonu o zaštiti podataka Europske unije (Direktiva o zaštiti podataka koja je 25. svibnja 2018. zamijenjena Općom uredbom o zaštiti podataka), istraživač donosi važne odluke u korištenju i otkrivanju Vaših osobnih podataka te će kao „kontrolor“ biti zajednički odgovoran za poštivanje tog zakona.

Putem istraživača imate pravo pristupiti svim prikupljenim podacima te tražiti njihove ispravke ako su netočni tijekom provođenja istraživanja.

Imate pravo na pritužbu na način kako se postupa s Vašim podacima, a možete je uputiti nadležnom odgovornom tijelu za provođenje zakona o zaštiti osobnih podataka. Popis nadležnih tijela u Europskoj uniji dostupan je na ovoj poveznici: [http://ec.europa.eu/justice/data-protection/article29/structure/data-protection-authorities/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/justice/data-protection/article29/structure/data-protection-authorities/index_en.htm). Za Republiku Hrvatsku nadležno tijelo kojem možete uputiti pritužbu je Agencija za zaštitu osobnih podataka, Selska cesta 136, 10 000 Zagreb.

Ako se povučete iz istraživanja, podaci prikupljeni prije Vašeg povlačenja neće se dalje obrađivati.

Imate pravo tražiti da se unište svi prethodno prikupljeni uzorci.

Ovo se istraživanje može provesti samo prikupljanjem i korištenjem Vaših osobnih podataka na način opisan u ovom informiranom pristanku te u njemu možete sudjelovati samo ako na to pristanete.

Ako imate bilo kakvih pitanja, komentara ili pritužbi u vezi s načinom na koji se postupa s Vašim podacima, najprije trebate kontaktirati istraživača, a on će Vaš zahtjev prosljediti osoblju odgovornom za zaštitu podataka.

### **KORIST ZA ISTRAŽIVAČA**

Rezultati istraživanja bit će korišteni u svrhu izrade diplomskog rada i objave znanstvenih radova.

### **TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE**

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo IMI-ja.

### **DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE**

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Ukoliko odlučite da ne sudjelujete u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u istraživanju. O takvoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku (ibrcic@imi.hr).

### **PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI**

Za dodatna pitanja o istraživanju možete se obratiti voditelju istraživanja, doc. dr. sc. Ireni Brčić Karačonji, na email: ibrcic@imi.hr.

Svojim potpisom potvrđujem da sam informiran/a o ciljevima, prednostima i rizicima ovog istraživanja i pristajem u njemu sudjelovati.

Zagreb, \_\_\_\_\_ god.

Ime i prezime ispitanika

Potpis ispitanika

\_\_\_\_\_  
(tiskanim slovima)

Ja, istraživač (ispitivač), potvrđujem da sam usmeno pružio potrebne informacije o ovom ispitivanju i ponudio/dao presliku Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača.

Potpis voditelja istraživanja

\_\_\_\_\_  
doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, ERT

<b>UPITNIK</b>	
<b>ŠIFRA ISPITANIKA:</b> _____	
Godina rođenja: _____	Spol: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Ž
Adresa stanovanja (ulica, kućni broj i mjesto): _____	
Kontakt (telefon/e-mail adresa): _____	
<b><u>Izloženost cigaretnom dimu</u></b>	
<input type="checkbox"/> <b>Nepušač</b> bez pasivne izloženosti cigaretnom dimu	
<input type="checkbox"/> <b>Pasivni pušač</b> – koliko ste sati dnevno izloženi cigaretnom dimu? _____ – koliko je sati/minuta proteklo između zadnje izloženosti i prikupljanja mokraće? _____ – gdje ste izloženi cigaretnom dimu (kod kuće, na radnom mjestu, na društvenim događanjima)? _____	
<input type="checkbox"/> <b>Pušač</b> – broj popušenih cigareta dnevno: _____ – koliko sati/minuta je proteklo između zadnje popušene cigarete i prikupljanja mokraće? _____	
Izloženost otapalima u slobodno vrijeme (benzin, boje, ljepilo):	
<input type="checkbox"/> <b>NE</b>	
<input type="checkbox"/> <b>DA</b> – opisati: _____	
Je li se Vaša izloženost benzenu (cigaretni dim, izloženost u slobodno vrijeme) u zadnja 24 sata razlikuje od uobičajene?	
<input type="checkbox"/> <b>NE</b>	
<input type="checkbox"/> <b>DA</b> – opisati: _____	
Datum prikupljanja mokraće: _____	
Vrijeme prikupljanja mokraće: _____	

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Doroteja Cindrić

Datum rođenja: 11. lipnja 1996.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

### Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Antuna Kanižlića, Požega

Osnovna Glazbena škola, Požega

2011.–2015. Gimnazija Požega

Srednja glazbena škola Požega

2015.–2019. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,

Sveučilište u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016. 9. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2017. 10. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2018. 11. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2019. 12. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. D. Cindrić, I. Krvarić, N. Smrečki, D. Vušak, B. Prugovečki, D. Matković-Čalogović, *Priprava, strukturna, termička i spektroskopska karakterizacija pirolidino- i piperidino-derivata glicina i glicinamida*, Peti simpozij studenata kemičara, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb, 2018.