

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA LUŽAR

**DOLOČANJE IZPOSTAVLJENOSTI KSILENOM V HISTOLOŠKEM
IN CITOLOŠKEM LABORATORIJU**

**DETERMINATION OF EXPOSURE TO XYLENE
IN HISTOLOGY AND CYTOLOGY LABORATORY**

MAGISTRSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2012

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Janeza Ilaša.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za strokovno pomoč pri nastajanju magistrske naloge, ter doc. dr. Janezu Ilašu za potrpežljivost in izdatno pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Prav tako bi se zahvalila družini in partnerju za oporo in razumevanje, ki sem ju potrebovala v času študija in izvedbi magistrskega dela.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Janeza Ilaša.

Polona Lužar

Ljubljana, 2012

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc

Mentor: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Somentor: doc. dr. Janez Ilaš

Član komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1 Struktura ksilenov	1
1.2 Fizikalno kemijske lastnosti ksilenov.....	2
1.3 TOKSIKOKINETIKA KSILENOV.....	4
1.3.1 Absorpcija	4
1.3.2 Porazdelitev.....	6
1.3.3 Presnova	7
1.3.4 Izločanje	9
1.3.5 Interakcije med topili.....	9
1.4 IZPOSTAVLJENOST KSILENOM IN NJIHOVI UČINKI	10
1.4.1 Kratkotrajna izpostavljenost in akutni učinki	12
1.4.2 Dolgotrajna izpostavljenost in kronični učinki	14
1.4.3 Genotoksičnost in mutagenost ksilenov.....	14
1.4.4 Kancerogenost ksilenov	15
1.4.5 Repruduktivna toksičnost ksilenov.....	15
1.4.6 Nevrotoksičnost ksilenov	15
1.4.7 Ekotoksičnost ksilenov	15
1.5 METODE DOLOČANJA KSILENOV	16

1.5.1	Določanje ksilenov v humanih bioloških vzorcih	16
1.5.2	Določanje ksilenov v okolju.....	17
1.5.3	Osnove kromatografije	18
1.5.4	HPLC-tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	19
1.5.5	Validacija HPLC metode.....	21
1.5.5.1	<i>Linearost</i>	21
1.5.5.2	<i>Točnost</i>	22
1.5.5.3	<i>Ponovljivost</i>	22
1.5.5.4	<i>Območje analize</i>	22
1.5.5.5	<i>Meja kvantifikacije</i>	22
1.5.5.6	<i>Selektivnost</i>	23
1.5.5.7	<i>Robustnost analitske metode</i>	23
1.5.5.8	<i>Postpreparativna stabilnost vzorcev</i>	23
2.	NAMEN DELA	24
3.	MATERIALI IN METODE.....	25
3.1	Materiali	25
3.1.1	Biološki material.....	25
3.1.2	Standardi.....	26
3.1.3	Reagenti in topila.....	29
3.1.4	Naprave in instrumentalni pribor	29
3.2	Metode	30
3.2.1	Postopki priprave in izbire raztopin standardov	30
3.2.1.1	<i>Priprava raztopine posameznega standarda za analizo metabolitov ksilena v vzorcu urina</i>	30

3.2.1.2 Izbira internega standarda	30
3.2.2 Priprava urinskih vzorcev.....	31
3.2.2.1 Priprava realnih urinskih vzorcev	31
3.2.2.2 Priprava urinskih vzorcev za razvoj metode.....	31
3.2.3 Razvoj kromatografske metode (HPLC).....	32
3.2.3.1 Izbira kolone.....	32
3.2.3.2 Razvoj optimalne mobilne faze	32
3.2.3.3 Izbira optimalnega pretoka mobilne faze	35
3.2.3.4 Izbira optimalne temperature kolone.....	35
3.2.3.5 Izbira optimalne valovne dolžine za detekcijo signala	35
3.3 Validacija metode	35
3.3.1 Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo	35
3.3.2 Priprava standardnih raztopin za določitev točnosti metode	37
3.3.3 Ponovljivost in postpreparativna stabilnost vzorcev	38
3.3.4 Aplikacija metode na realne urinske vzorce.....	39
4. REZULTATI.....	40
4.1. Izbira internega standarda	40
4.2. Razvoj kromatografske metode (HPLC).....	40
4.3. Končna optimizirana HPLC metoda	43
4.4. Validacija metode	44
4.4.1. Linearnost	44

4.4.2. Točnost	44
4.4.3. Ponovljivost.....	47
4.4.4. Območje	48
4.4.5. Meja kvantifikacije	48
4.4.6. Selektivnost	49
4.4.7. Aplikacija metode na realne vzorce urina	49
5. RAZPRAVA	53
6. SKLEPI.....	58
7. LITERATURA.....	59
8. PRILOGE	62

SEZNAM OKRAJŠAV

ACHIG- Ameriška vladna konferenca za industrijsko higieno (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)

AUC- površina pod krivuljo

BPK- biološka potreba po kisiku

cDNK- komplementarna deoksiribonukleinska kislina

CV- koeficient variance

CŽS- centralni živčni sistem

EC₅₀- koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka

EPA- Agencija za zaščito okolja

FID- plamensko-ionizacijski detektor

FDA- Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration)

GC- plinska kromatografija

GIT-gastrointestinalni trakt

HK- hipurna kislina

HPLC- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

IARC- Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer)

IC₅₀- inhibitorna koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka

IS- interni standard

IUPAC- Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Konc.- koncentracija

KTV- faktor kratkotrajne izpostavljenosti

LC- tekočinska kromatografija

LC₅₀- 50 % smrtna koncentracija

LD₅₀- 50 % smrtna doza

LLOQ- spodnja limita kvantifikacije

LOD- limita detekcije

MF- mobilna faza

MDK- maksimalna dovoljena koncentracija

MW- molekulska masa

MS- masni spektrometer

NOISH- nacionalni inštitut za varovanje zdravja (National Institute of Occupational Safety and Health)

NTP- nacionalni toksikološki program (National Toxicology Program)

PPM- število masnih ali volumskih delov izbrane snovi v milijonu delov raztopine ali zmesi (parts per million)

PPT- število masnih ali volumskih delov izbrane snovi v trilijonu delov raztopine ali zmesi (parts per billion).

Povp.- povprečje

QC- kontrolni vzorci

S- standard

SD- standardni odklon

SF-stacionarna faza

T- temperatura

TLC- tankoplastna kromatografija

POVZETEK

Ljudje se vsakodnevno srečujemo in rokujemo z velikim številom kemikalij, bodisi v domačem okolju ali v okolju, v katerem smo zaposleni. Zaradi specifične obdelave in priprave biološkega materiala v histološkem in citološkem laboratoriju narava dela zahteva uporabo različnih kemikalij, med katerimi so tudi ksileni.

Ksileni so organska topila, ki lahko vstopajo v telo preko dihal, prebavil ali kože. So dobro hlapna topila, ki se najpogosteje in najbolje absorbirajo preko dihal. V kri se hitro absorbirajo in prehajajo v sistemski obtok. Problem je vsakodnevna izpostavljenost vplivom ksilenov zaposlenih, saj je le ta relativno slabo opredeljena, posebej, ko gre za dolgotrajno izpostavljenost nizkim koncentracijam.

V magistrski nalogi smo razvili metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo, katere namen je bil določiti koncentracije prisotnih metabolitov ksilena v urinu preiskovancev, ki so zaradi strokovnosti in narave dela vsakodnevno izpostavljeni ksilenom.

Metodo smo razvijali v večih korakih, pri katerih smo ugotovljali najboljše možnosti za optimalno doseganje dobrih in zanesljivih rezultatov. Najprej je sledila optimizacija kromatografske ločbe, pri kateri smo izbrali ustrezno kolono (Phenomenex Kinetex C18, 2,6 μm , 100 \times 4,6 mm), interni standard (4-hidroksi benzojska kislina), določili optimalno sestavo mobilne faze (0,1 % TFA v 90 % bidestilirane vode in 10 % acetonitrila), pretok mobilne faze (1,5 mL/min) in temperaturo kolone (25 °C). Tako smo zagotovili dobro resolucijo preiskovanih analitov in zagotovili čim krajši čas analize (12 min). Preiskovane analite smo detektirali pri valovni dolžini 210 nm, saj so bile pri tej valovni dolžini absorbcijske vseh analitov primerljive. Po optimizaciji je sledila validacija metode. Postopek validacije je potekal po smernicah FDA. Metoda je bila linear na območju 6-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za preiskovane analite, točna (do vključno koncentracije 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in ponovljiva (vrednosti koeficientov variance so pri vseh standardih znosili meje dovoljenih odstopanj). Meja kvantifikacije za orto-metil hipurno kislino znaša 6,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, za meta- ter, para-metil hipurno kislino pa 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Določili smo tudi mejo detekcije, ki za orto-metil hipurno kislino znaša 2,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, za meta- ter, para-metil hipurno kislino pa 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Šibkost metode je njena selektivnost, saj nam ni uspelo popolnoma ločiti meta- in para-metil hipurne kisline.

Po validaciji smo metodo aplicirali na realne vzorce urina osmih preiskovancev (1 moški in 7 žensk) in kontrolne skupine sedmih ljudi (2 moška in 5 žensk) podobne starosti.

Metoda se je izkazala kot primerna za direktno določanje metabolitov orto-, meta-, para-metil hipurnih kislin v urinu in tako preko metabolitov tudi izpostavitvi ksilenom.

Pri analizi urinskih vzorcev kontrolne skupine, ki ni bila izpostavljena ksilenom, nismo zaznali prisotnosti metil hipurnih kislin. Na težavo smo naleteli, saj se nam je tako pri kontrolnih vzorcih, kot kasneje tudi pri preiskovancih pojavljal signal pri približno identičnemu retencijskemu času 4,9. Retencijski časi so podobni kot pri testiranju standarda hipurne kisline, ki znaša 4,936. Zato predvidevamo, da imamo v kontrolnih vzorcih prisotno tudi hipurno kislino in sicer v naslednjih koncentracijah: kontrolni vzorec 1: 512,7 µg/mL, kontrolni vzorec 2: 213,8 µg/mL, kontrolni vzorec 3: 243,8 µg/mL, kontrolni vzorec 4: 77,8 µg/mL, kontrolni vzorec 5: 304,9 µg/mL, kontrolni vzorec 6: 398,3 µg/mL in kontrolni vzorec 7: 35,3 µg/mL.

Urinski vzorci preiskovancev, ki so bili v stiku s ksileni, so bili odvzeti v dveh različnih obdobjih. Pri preiskovancih št.1, 2 in 3, smo izvedli šest odvzemov urinskega vzorca, pri preiskovancih 4, 5, 6, 7 in 8, pa po tri odvzeme. Skupne koncentracije metabolitov (povprečne vrednosti posamezne metil hipurne kisline in njihova vsota v različnih časovnih obdobjih) so višje pri preiskovancih (vzorci št. 1-6) histološkega laboratorija kot pri preiskovankah (vzorca št. 7 in 8) citološkega laboratorija. Vsote koncentracij metil hipurnih kislin (najnižja in najvišja vrednost, v različnih časovnih obdobjih) so naslednje: preiskovanec 1: 9,85-587,4 µg/mL, preiskovanec 2: 12,9-243,9 µg/mL, preiskovanec 3: 6,0-138,5 µg/mL, preiskovanec 4: 188,9-330,5 µg/mL, preiskovanec 5: 27,4-75,1 µg/mL, preiskovanec 6: 16,2 -50,3 µg/mL, preiskovanec 7: 14,1-19,3 µg/mL in preiskovanec 8: 33,9-50,3 µg/mL.

Rezultati analize so potrdili prisotnost metil hipurnih kislin v urinu zaposlenih v histološkem in citološkem laboratoriju. Koncentracije posameznih izomerov ksilena in njihove skupne vrednosti koncentracij v urinskih vzorcih preiskovancev, so znotraj mejnih vrednosti (BAT vrednosti) koncentracij metil hipurnih kislin v urinu zaposlenih po zaključenem delovniku, ki jih predлага Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG- Nemška raziskovalna fundacija). Predlagana skupna mejna vrednost koncentracij metil hipurnih kislin v urinu znaša 2000 mg/L.

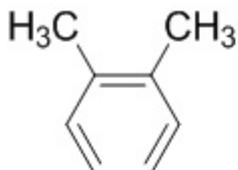
Ksileni so topila, ki vstopajo v telo preko dihal, prebavil in kože, zato je potrebno pravilno rokovanje. Na delovnem mestu se mora zagotoviti ustreznega zaščita pred izpostavitvijo v smislu ustvarjanja ustreznih delovnih pogojev (digestoriji, zračne pregrade, odsesavanje, itd). Smiselno je tudi izobraževati zaposlene, o rokovanju s kemikalijami, zlasti v smeri seznanjanja s tveganjem za zdravje, če opustijo zaščitna sredstva (maske in rokavice) in redno izvajati biološki monitoring izpostavljenosti.

1. UVOD

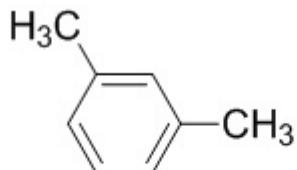
Ksileni ($C_6H_4(CH_3)_2$) so raznolika skupina spojin, ki spadajo med aromatske ogljikovodike. Gre za organska topila, ki se uporabljajo v različnih proizvodno-tehnoloških procesih v industriji, nizkim koncentracijam pa smo vsakodnevno izpostavljeni tudi pri delu v histološkem in citološkem laboratoriju. Pogosto se uporabljajo za raztopljanje ali redčenje trdnih ali tekočih nehlapljivih organskih spojin, pri tem pa se kemično ne spremenijo. So sestavine barv, lakov, črnih, aerosolnih sprejev, barvil, lepil, naftnih derivatov in so izhodne spojine za različne kemijske sinteze (1).

1.1 Struktura ksilenov

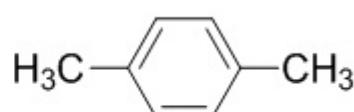
Ksileni so derivati benzena. Kemijsko jih uvrščamo med dimetil benzene. Poimenujemo jih z naslednjimi sinonimi: ksilol, violet 3... Osnova spojine je benzenski obroč, na katerega sta vezani metilni skupini. Metilne skupine se lahko vežejo na tri različne načine, katerih rezultat so trije različni izomeri dimetil benzena: orto-, meta- in para-izomer. Izraz celokupni ksileni se nanaša na vse že prej omenjene izomere. Poznamo pa tudi mešane ksilene, kateri poleg orto-, meta- in para-izomerov vsebujejo še 6-15 % etil benzena (2).



1,2-dimetil benzen
1,2-ksilen
o-ksilen



1,3-dimetil benzen
1,3-ksilen
m-ksilen



1,4-dimetil benzen
1,4-ksilen
p-ksilen

Slika 1: Strukturne formule treh izomerov ksilena: orto-, meta- in para- ksilena.

Položaje metilnih skupin določamo s štetjem od poljubno izbranega ogljikovega atoma po najbližji poti do naslednjega ogljikovega atoma z metilno skupino. Tako pridemo tudi do imen spojin, kot jih določa IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Po IUPAC nomenklaturi je tako orto-ksilen 1,2-dimetil benzen, meta ksilen 1,3-dimetil benzen in para-ksilen 1,4-dimetil benzen (2, 3).

Tabela I: Poimenovanje ksilenov (povzeto po 4)

Kemijsko ime	Mešani ksileni	o-ksilen	m-ksilen	p-ksilen
Sopomenke	dimetil benzen	1,2-dimetil benzen	1,3-dimetil benzen	1,4-dimetil benzen
metil toluen	ksilol	1,2-ksilen	1,3-ksilen	1,4-ksilen
		orto-dimetil benzen	meta-dimetil benzen	para-dimetil benzen
		orto-metil toluen	meta-metil toluen	para-metil toluen
		orto-ksilol	meta-ksilol	para-ksilol
		orto-ksilen	meta-ksilen	para-ksilen
Molekulska formula	$C_6H_4(CH_3)_2$	$C_6H_4(CH_3)_2$	$C_6H_4(CH_3)_2$	$C_6H_4(CH_3)_2$

Opombe: Mešani ksileni poleg orto-, meta- in para- ksilena vsebujejo še nekaj % etil benzena.(2)

Zaradi sorodne kemijske strukture imajo ksileni in etil benzen podobne fizikalno-kemijske lastnosti. Le te se pri posameznih izomerih minimalno razlikujejo (1).

1.2 Fizikalno kemijske lastnosti ksilenov

Ksileni so pri sobni temperaturi brezbarvne tekočine sladkega vonja. Opozoriti je potrebno osebe, ki rukujejo z njimi, da gre za hitro vnetljivo snov. Naravno se pojavlja v nafti in v katranu ter v dimu pri gozdnih požarih. Ksilene lahko vonjamo, kadar je njihova koncentracija v vdihanem zraku med 0,08 in 3,7 delcev ksilena na milijon delcev (ppm, 1 ppm = $4,35 \text{ mg/m}^3$ zraka) zraka. V vodi jih okusimo, kadar je koncentracija ksilena v njej med 0,53 in 1,8 ppm. V topnosti ni velike razlike med izomeri.

Tabela II: Fizikalno-kemijske lastnosti ksilenov (povzeto po 4)

	Mešani ksileni	o-ksilen	m-ksilen	p-ksilen
Molekulska masa (g)	106,16	106,16	106,16	106,16
Temp. tališča	ni podatka	-25°C	-47.4 do -48°C	13 do 14°C
Temp. vrelišč	137 do 144°C	144°C	138 do 139°C	137 do 144°C
Gostota (g/mL)	pri 20°C: 0.860	pri 20°C: 0.8301	pri 15°C: 0.8684 pri 20°C: 0.8642	pri 20°C: 0.860
Agregatno stanje (normalni pogoji)	tekočina	tekočina	tekočina	tekočina pri nizki temperaturi v obliki plastične železe
Barva	brezbarven	brezbarven	brezbarven	brezbarven
Vonj	sladek	sladek	sladek	sladek
Prag zaznave (ppm)				
zrak	0.0045-0.1	0.08-0.17	3.7	0.0045-0.1
voda	0.17	1.8	1.1	0.17
Topnost:	netopen	netopen	netopen	netopen
voda	pri 25°C: 0.013 g/100L (130 ppm)	pri 0°C: 142 mg/mL (142 ppm)	pri 20°C: 160 mg/mL (160 ppm)	pri 25°C: 160 mg/mL (160 ppm)
		20°C: 175 mg/mL (175 ppm) 25°C: 175 mg/mL (175 ppm) do 213 mg/mL (213 ppm)	25°C: 160 mg/mL (160 ppm) do 173 mg/mL (173 ppm)	198 mg/mL (198 ppm)
Parni tlak	pri 7°C: 2.50 mm Hg 20°C: 6.16 mm Hg 21°C: 6.72 mm Hg	pri 20°C: 5.0 mmHg 25°C: 6.8 mm Hg 30°C: 9.0 mm Hg	pri 20°C: 6.0 mm Hg 28.3°C: 10.0 mm Hg 30°C: 11.0 mm Hg	pri 20°C: 6.0 mm Hg 25°C: 8.82 mm Hg 30°C: 11.0 mm Hg 27.3°C: 10.0 mm Hg
Henrijeva konstanta	ni podatka	25°C: 5.19×10^{-3} atm·m ³ /mol	25°C: 7.19×10^{-3} atm·m ³ /mol	25°C: 7.6×10^{-3} atm·m ³ /mol

Ksileni so topni v alkoholu, acetonu, benzenu in etru, a praktično netopni v vodi. Iz tega sledi, da se odlično raztopljujo v maščobah. Stabilnost se jim zmanjša pri višjih temperaturah, zgorijo pa lahko že ob stiku z iskro (3).

Razlika v temperaturi zmrzišča med para-ksileni in ostalimi aromatskimi spojinami z osmimi ogljikovimi atomi se uporablja za ločitev para-ksilenov. Derivati hipurne kisline kot glavni presnovni metaboliti so lahko posledica določenih preservativov v hrani, lahko pa tudi posledica izpostavitve etil benzenom in stirenom (5).

Na ksilnih lahko potekajo številne kemijske reakcije. Gre za reakcije izomerizacije, disproporcionacije in dealkilacije. Kisline katalizirajo interkonverzije vseh treh izomernih

oblik ksilenov. Tako npr. reakcija izomerizacije pri nižjih temperaturah privede do nastanka večjih količin para-ksilena kot orto-ksilena (6).

1.3 TOKSIKOKINETIKA KSILENOV

Toksikokinetika zastrupitve s ksileni preučuje pot topila od mesta vstopa v telo (preko dihal, prebavil ali kože), njegove absorpcije v krvni obtok, porazdelitve topila v tkivih (distribucija), njegovo presnovo (metabolizem) in izločanje (eliminacijo) iz telesa (1).

Pri ljudeh, ki so bili izpostavljeni ksilenom tako, da so jih vdihovali, poteče absorpcija v več kot 50 %. Zaradi njihove lipofilne narave in hlapnosti, poteče absorpcija v človeškem telesu po izpostavitvi zelo hitro. Ksileni se nalagajo v maščobnem tkivu (3).

Po absorpciji so ksileni podvrženi reakcijam metabolizma. Metabolične reakcije potečejo zelo hitro, zato se metaboliti tudi hitro izločijo iz telesa. Koncentracije metabolitov v urinu so mnogo večje kot v krvi, kjer so komaj zaznavne (7). Primarno so ksileni v krvi vezani na serumske proteine. Merjenje oz. določitev koncentracij ksilenov v krvi je omejeno zaradi hitrega metabolizma samih ksilenov (3).

Glavni presnovni metaboliti ksilenov v urinu so metil hipurne kisline (2-metil hipurna kislina, 3-metil hipurna kislina in 4-metil hipurna kislina) kot tudi derivati hipurne kisline (7). Določanje derivatov hipurne in metil hipurnih kislin v urinu je najpogosteje uporabljen kazalec izpostavljenosti ksilenom (3).

Toksični učinek, ki ga povzročijo ksileni, je sorazmeren s koncentracijo topila in njegovih presnovkov v tarčnih organih, katere najbolj prizadane. Toksičnost je odvisna od topila samega, načina in količine izpostavljenosti, trajanja izpostavljenosti, individualne občutljivosti in interakcije z ostalimi spojinami. Izpostavljenost je lahko kratkotrajna in povzroči akutne toksične učinke ali dolgotrajna, ki povzroči kronične okvare organizma. Zato je izrednega pomena redno spremljanje in vzdrževanje koncentracij ksilenov v delovnem okolju v mejah dovoljenega (1).

1.3.1 Absorpcija

Ksileni lahko vstopajo v telo preko dihal, prebavil ali kože. So dobro hlapna topila, ki se najpogosteje in najbolje absorbirajo preko dihal (1). Zaradi dobre topnosti se v krvi hitro absorbirajo in prehajajo v sistemsko cirkulacijo. Študije, ki so jih izvedli, so pokazale, da je

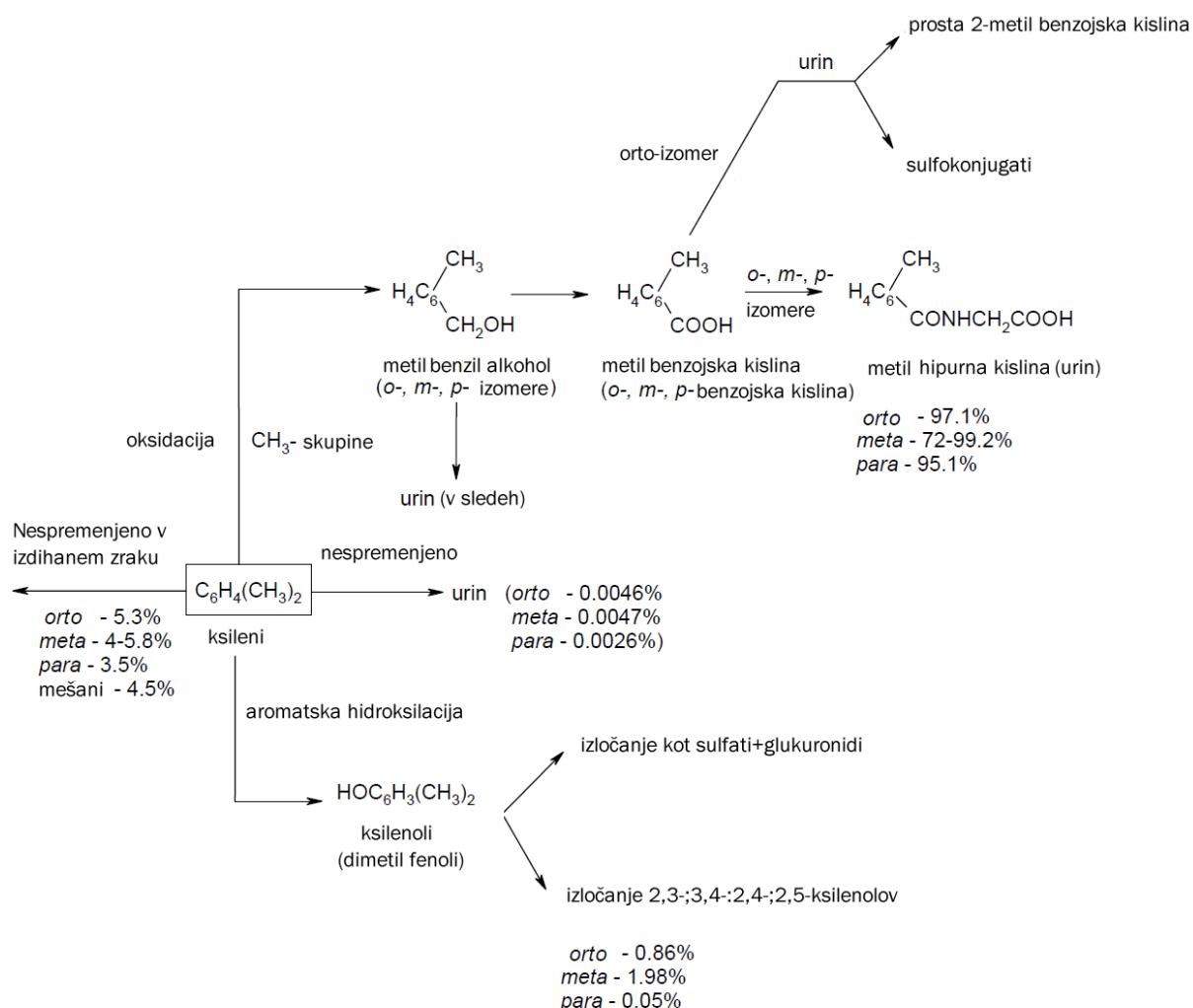
absorbcija različnih izomerov enaka. Razlog za to naj bi bila relativno majhna molekulska masa in podobne kemijske lastnosti vseh treh izomerov (3).

Ob izpostavitvi preko dihal večji delež absorpcije poteka v alveolih, manjši pa se absorbira v zgornjih dihalnih poteh. Kako dobro bo potekla absorpcija, je odvisno od alveolne ventilacije, difuzije preko membrane alveolov, topnosti topila v krvi in pretoku krvi skozi pljuča. Topnost ksilenov v krvi je odvisna od koeficiente porazdelitve kri-zrak, ki predstavlja ravnotežno razmerje koncentracij spojine med krvjo in zrakom (8). Absorbiran del ksilenov se prenosa s krvjo v različna tkiva, neabsorbiran pa se izloča z izdihanim zrakom (8).

Približno 60 % vdihanega ksilena se zadrži v telesu. Več kot 90 % absorbiranih ksilenov se izloči v urin v obliki metil hipurne kisline. Aromatska hidroksilacija ksilenov do ksilenola se pri ljudeh pojavi v omejenem obsegu. Manj kot 2 % absorbiranega ksilena se ga v uri izloči kot ksilenol. V urinu lahko v sledovih zaznamo tudi metil benzilni alkohol, konjugate z glukuronsko kislino in konjugate oksidiranih ksilenov (3).

Če ksilene zaužijemo, poteče absorpcija preko prebavil. Pri teščih posameznikih se maksimalne koncentracije v krvi dosežejo v nekaj minutah po vnosu. Peroralno vnešen odmerek se običajno popolnoma absorbira v krvni obtok v kar 90 %. Absorpcaja pa se upočasni ob prisotnosti hrane z visoko vsebnostjo maščob. Absorpcaja poteče tudi ob stiku s kožo, vendar v znatno manjšem obsegu.

Izpostavitev ksilenom preko kože lahko povzroči lokalne in sistemske učinke. Ksileni kot lipofilna topila s pasivno difuzijo prehajajo roženo plast, ki predstavlja glavno pregrado za absorpcijo. Koncentracija topila, trajanje izpostavljenosti, integriteta kože, lipofilnost in molekulska masa topila, so pomembni dejavniki, ki vplivajo na hitrost absorpcije preko kože in to velja tudi za ksilene (3).



Slika 2: Presnova ksilenov (povzeto po 3).

1.3.2 Porazdelitev

Po absorpciji v krvi se ksileni privzamejo v tkiva glede na krvni pretok v tkivu, maso tkiva in porazdelitvenega koeficiente med tkivom in krvjo. Kljub temu, da so dobro topni v plazmi, se polovica absorbirane količine prenaša vezano na proteine. Ksileni se v krvi lahko vežejo na fosfolipide, lipoproteine in holesterol (1). Absorbirani ksileni se v venozni krvi porazdelijo v 12 % v celice, v 88 % pa se porazdelijo v serumu (3). Ob izpostavitvi ksilenom je najbolj prizadet organ centralno živčevje, v manjši meri pa so lahko prizadeta tudi jetra in ledvice. Zaradi lipofilnosti se po vnosu hitro kopičijo v možganih. Le ti so primer dobro prekravljenega tkiva z visoko vsebnostjo lipidov. Ksileni se v maščobnem tkivu, ki je slabše prekravljeno, počasneje kopičijo in nato počasneje porazdelijo nazaj v krvni obtok (9).

1.3.3 Presnova

Presnova ksilenov večinoma poteka v jetrih in najbolj vpliva na obseg toksičnosti.

V 1. fazi razgradnje (biotransformacije) poteka bodisi presnovna deaktivacija oz. detoksifikacija, pri čemer se spojina spremeni v manj bioaktivno spojino, ali presnovna aktivacija oz. bioaktivacija, kjer pride do tvorbe bolj reaktivnih in toksičnih presnovkov od izvorne spojine. Ksileni so netopni v vodi, v procesu presnove pa se spremenijo v vodotopne spojine, ki se izločijo z urinom (1). Glavno metabolično pot predstavlja reakcija oksidacije stranske metilne skupine, kjer se ksileni pretvorijo do toluidne kisline (metil benzojske kisline) (7).

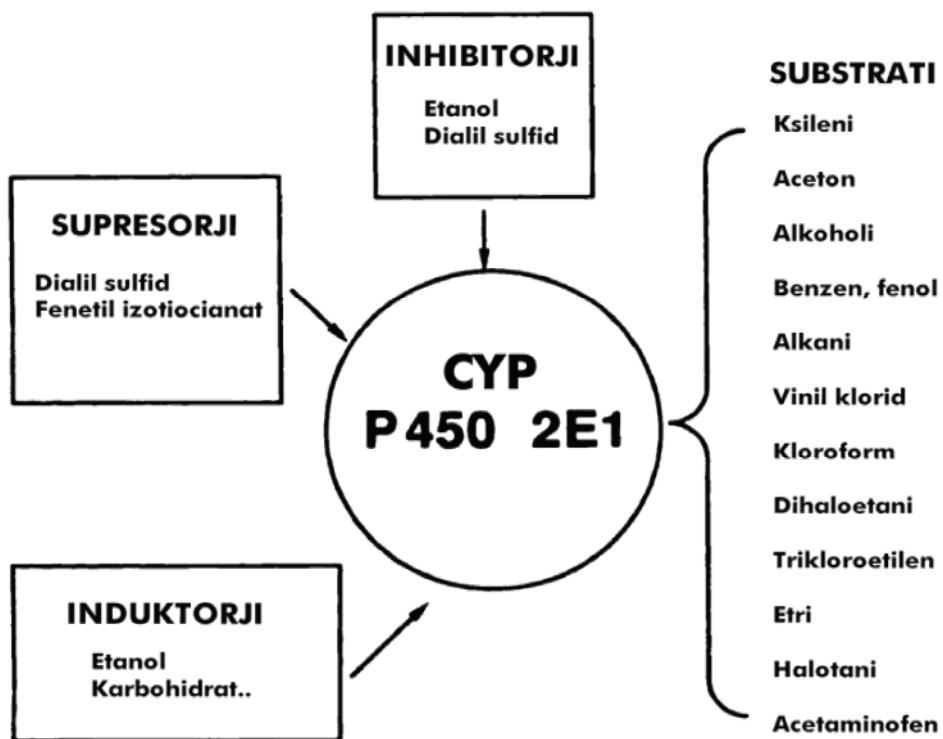
Prvo fazo metabolične pretvorbe ksilenov katalizirajo citokromi. Le ti katalizirajo reakcije oksidacije in redukcije (10). Glavni katalitični encim oksidacije ksilenov je CYP2E1. Največ te izoblike citokromov se nahaja v jetrih, v manjših količinah pa tudi v ledvicah, pljučih, možganih, testisih in ostalih tkivih. Odgovoren je za oksidacijo mnogih ogljikovodikov (10). CYP2E1 je znan, da oksidira več kot sedemdeset različnih, večinoma nizko molekulskih, planarnih (aromatskih) ksenobiotikov (11).

CYP2E1 je primarni encim, ki je vpletен v metabolizem in pretvori metil benzil alkohola do nastanka izomerov metil hipurne kisline (3). Omogoča tudi presnovo številnih majhnih molekul, kot so etanol (tudi ostale alkohole), aceton, kloroform, anilin, etre, dihaloetane in ostale majhne, halogenirane ogljikovodike.

Do indukcije encimov CYP2E1 lahko pride v primeru dolgotrajne izpostavitve določenim organskim topilom. V primeru kroničnega konzumiranja etanola se stopnja metabolizma in toksičnost omenjenih spojin poveča, medtem ko akutni učinek alkohola povzroči kompetitivno reakcijo s CYP2E1 in s tem zmanjša nastanek metabolitov iz ksilena (12, 13).

Akutno konzumiranje etanola upočasni presnovo nekaterih zdravilnih učinkovin (benzodiazepinov, barbituratov, metadona, varfarina..) in tudi ksilena.

Določene kemikalije dodane prehranskim izdelkom vplivajo na aktivnost in raven izoencimov P450 tako, da povzročijo inhibicijo encima. Aktivnost CYP2E1 je odvisna tudi od prehranskih inhibitorjev in supresorjev encimov. Med pogostejšimi sta prisotna dialil sulfid in fenetyl izotiocianat, kot kompetativna inhibitorja (13, 14).



Slika 3: Spojine kot efektorji in substrati za CYP2E1 (povzeto po 13).

Tabela III: Izoblike P450, ki so vključene v metabolizem ksilenov (15)

Substrat	Metaboliti	CYP1A1/2 ^a MC-inducibilna oblika	CYP2B1/2 PB-inducibilna oblika	CYP2C11/6 Konstitutivna oblika	CYP2E1 Konstitutivna oblika	CYP3A1/2 Konstitutivna oblika
Ksilen	Metil benzilni alkohol	ND	+	ND	+	ND

Legenda: MC: 3-metil kolantren, PB: fenobarbital, ND (not determined): nedoločeno, +: vključen v metabolizem. Uporabljeno je bilo izražanje CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11/6 in CYP3A1/2. Anti-CYP2E1 navzkrižno reagira z ustrezno poddržino- CYP1A2, CYP2B2, CYP2C6 in CYP3A2.

Drugo fazo razgradnje (konjugacija) katalizirajo različni encimi reakcij konjugacije (glukuronidacije, acetiliranje, sulfatacije..) (1). Posledica konjugacije toluidnih izomerov z glicinom je nastanek orto-, meta-, para-metil hipurne kisline (7).

Njihov namen je dodatno povečati polarnost presnovka in tako pospešiti njihovo izločanje preko ledvic z urinom (1). Tako se metil hipurna kislina izločena v urin uporablja kot marker izpostavitve ksilenom za biomonitoring (3).

1.3.4 Izločanje

Del ksilenov, ki se je absorbiral in pretvoril v polarnejše presnovke, se izloča preko ledvic z urinom. Drugi, nespremenjeni del pa se vrača z venozno krvjo v pljuča in se izloča z izdihanim zrakom (8). Manj kot 10 % absorbiranega ksilena se po drugih metabolnih poteh izloča v nespremenjeni obliki (3).

Delež izdihanih ksilenov je odvisen od hitrosti pljučnega krvnega obtoka, porazdelitvenega koeficiente zrak-kri, samega topila in hitrosti alveolne ventilacije. Ksileni se zaradi hlapnosti in lipofilne narave v večji meri izdihajo, saj imajo visok porazdelitveni koeficient zrak-kri (8).

Pri izločanju ksilenov iz organizma ima pomembno vlogo delež maščobnega tkiva (8). Približno 4-10 % absorbiranega ksilena je shranjenega v maščobnem tkivu. Pri posamezniku z visokim indeksom maščobnega tkiva poteka izločanje ksilenov iz organizma zelo počasi (3).

Koncentracije ksilenov v krvi hitro upadejo v začetni stopnji izločanja, saj telesno maščevje poveča volumen porazdelitve. Izplavljanje ksilenov iz maščobnega tkiva ob koncu izločanja je podaljšano zaradi počasnega krvnega pretoka v maščobnem tkivu in visokega porazdelitvenega koeficiente maščobno tkivo-kri (1). Tako je eliminacija ksilenov pogojena z individualnimi lastnostmi posameznika (3).

1.3.5 Interakcije med topili

Različne študije, ki so bile opravljene na ljudeh in živalih, so ovrednotile, da ksileni v prisotnosti različnih organskih topil, alkoholov in zdravil (aspirina, fenobarbitala), povzročajo različne interakcije. Ugotovili so, da so ksileni visoko potencialni za interakcije s številnimi substancami, saj inducirajo mikrosomalne encime v jetrih (16, 17, 18). Kateri od mikrosomalnih encimov bo prizadet, je odvisno od izomera ksilenov. Tako je meta- izomer močnejši induktor P450 2B encimov kot para- izomer (19). Kombinacija sočasne izpostavitve etanolu in ksilenom privede do makrocitoze in zmanjša prepustnost eritrocitne membrane (20). Prav tako povzroči zmanjšanje koncentracije meta-ksilenov v krvi in alveolarnem zraku med in po sočasni izpostavljenosti, ob koncu le te pa poveča izločanje meta-metil hipurne kisline v urinu. Študije kažejo, da je zaužitje etanola v preteklih dveh dneh dovolj, da se ob izpostavitvi ksilenom popolnoma spremeni kinetika meta-ksilenov pri ljudeh. Spremembra kinetike meta-ksilenov je bila potrjena pri visokih koncentracijah izpostavljenosti ksilenom (okoli 400 ppm). V nasprotju pa se pri nižjih koncentracijah (okoli 100 ppm), meta-ksileni popolnoma metabolizirajo in je vpliv indukcije mikrosomalnih encimov le obroben. Rezultati

Študije, ki je temeljila na farmakokinetičnem modelu podpirajo hipotezo, da je učinek indukcije mikrosomalnih encimov na metabolizem meta-ksilenov po zaužitju etanola odvisen od koncentracije izpostavljenosti ksilenom. Hipotezo so potrdili tudi preizkusi opravljeni na dvajsetih eksperimentalnih živalih. Podgane so tri tedne izpostavliali visokim koncentracijam ksilenov (500 ppm) in etanolu. Metabolizem meta-ksilenov je bil petkrat povečan. Ko so podgane izpostavili nižjim koncentracijam 50 ali 100 ppm, ni prišlo do pomembnih sprememb v koncentracijah meta-ksilenov bodisi v krvi ali v izločanju metilmethyl hipurne kisline v urinu (21, 22).

Toksični učinki vpliva izpostavitve mešanici topil so lahko različni. Tako kronično uživanje alkohola povzroči indukcijo CYP 2E1, hkrati pa pospeši presnovo ostalih topil s pomočjo citokromov. Nasprotno pa zaužitje alkohola tik pred izpostavitvijo ksilenom kompetativno zavira njegovo presnovo (23).

Tako kombinacija meta-ksilenov in metil etil ketonov (2-butanona) povzroči sinergistični učinek na mikrosomalne encime pri podganah, pri ljudeh pa povzroči inhibicijo metabolizma pretvorbe meta-ksilenov do metilmethyl hipurne kisline. Rezultat so povečane koncentracije oz. prisotnost ksilenov v krvi in maščobnem tkivu. Tako kaže, da je inhibicija pretvorbe ksilenov do metilmethyl hipurne kisline specifična ob prisotnosti drugih kemikalij (18).

1.4 IZPOSTAVLJENOST KSILENOM IN NJIHOVI UČINKI

Ksileni imajo različne škodljive učinke na organizem, ki so lahko nespecifični ali specifični. Med nespecifične učinke prištevamo takojšen lokalni učinek zaradi lokalnega draženja kože, sluznic in oči, ter sistemski učinek, ki se kaže v obliki depresije osrednjega živčevja (t.i. narkotični učinek) in motnje srčnega ritma. Prisotnost par ksilenov in etil benzena v zraku dražijo oči in nos, izzovejo kašelj in hripavost, ob daljši izpostavitvi pa lahko nastane pljučni edem (1).

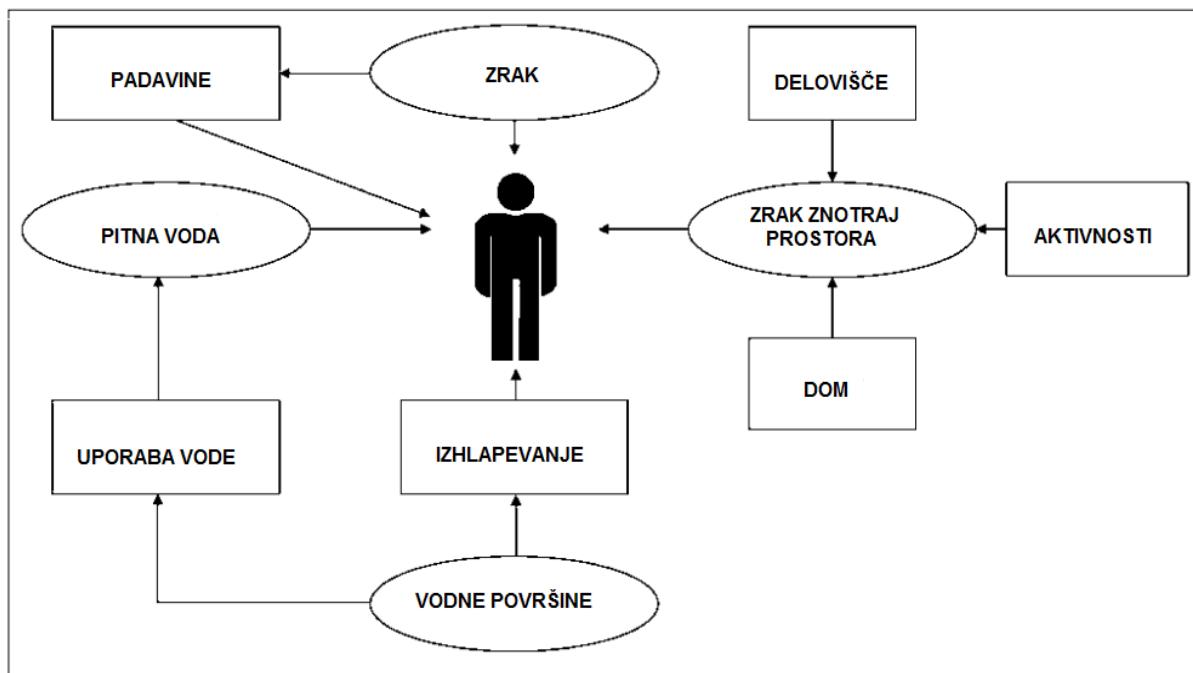
Specifični učinki nastopajo z zakasnitvijo več ur ali dni po zaužitju ali inhalaciji. Specifična učinka izpostavljenosti ksilenom se nanašata na vplive respiratornega in živčnega sistema. Številne študije opravljene na ljudeh so dokazale, da je respiratorični sistem izredno občutljiv tako na kratkotrajno kot dolgotrajno izpostavitev ksilenom. Enkratna izpostavitev ksilenom v zraku s koncentracijami med 50 in 700 ppm, ponovna izpostavitev koncentracijam 100 ppm ali kronična izpostavitev pri 14 ppm, povzročajo draženje nosu in gbla. Blago povečane ocene

resnosti za dihalne težave in majhne spremembe v merljivih parametrih pljučne kapacitete se pojavijo po akutni izpostavitvi meta-ksilenom pri koncentraciji 50 ppm (3).

Pri ljudeh se pri akutnem trajanju izpostavitve meta-ksilena koncentracije 50 ppm in kroničnemu trajanju izpostavitve mešanim ksilenom koncentracije 14 ppm pojavijo blagi učinki na centralni živčni sistem. Ti se odražajo v obliki glavobola, utrujenosti in vrtoglavice. Akutna izpostavitev hlapom mešanih ksilenov koncentracije 100 ppm ali 200 ppm metaksilena privede do motnje v kratkotrajnem spominu in odzivnosti. Študije opravljene na živalih so pokazale, da so mešani ksileni in posamezni izomeri ksilena v zraku v koncentracijah 50 do 2.000 ppm nevrotoksični (3).

Specifični in nespecifični učinki se lahko medsebojno seštevajo, pogosteje pa delujejo sinergistično (1).

Ksilenom smo lahko izpostavljeni kratkotrajno, kar povzroči akutne toksične učinke, ali pa dolgotrajno, kar povzroča kronične okvare organizma. Njihova toksičnost je odvisna od številnih dejavnikov, kot so toksičnost topila samega, način, količina in trajanje izpostavljenosti, individualne interakcije in interakcije z ostalimi spojinami.



Slika 4: Shematični prikaz poti vstopa ksenobiotikov v človeški organizem (povzeto po 39).

1.4.1 Kratkotrajna izpostavljenost in akutni učinki

Ksileni lahko vstopajo v telo skozi dihala ali prebavila. Povzročajo lokalno draženje sluznic. Nizke koncentracije ksilenov dražijo sluznice oči, nosnega dela žrela, pojavi se slabost, razdražljivost in motnje reakcijskega časa ter kratkotrajnega spomina. Hlapi ksilena povzročajo vrtoglavico, glavobole, duševno zmedenost, prihaja do motenj ravnotežja in spanca ter pomankanja teka. LD₅₀ pri podganah znaša 8000 ppm/4h, pri miših pa 3907 ppm/6h. Študije na podganah o izpostavitvi hlapom orto-ksilena so pokazale, da LD₅₀ za orto-ksilen pri podganah znaša 6350 ppm/4h in 6700 ppm/6h.

Vdihavanje par ksilena povzroča motnje spomina, razpoloženja, ravnotežja, spanca ter vodi do nastanka glavobola in pomanjanja teka. Pri zaužitju nastane pekoča bolečina v trebuhu, pojavi pa se lahko reverzibilna hepatotoksičnost in glikozurija. Pri zaužitju ksilena znaša 50 % letalna doza (LD₅₀) pri podganah 10 mL/kg ali 4,3 g ksilena/kg in pri miših 1500 mg ksilena/kg (24, 25, 26).

Eksperimentalne raziskave kažejo, da dermalna izpostavitev ljudi ksilenom povzroča draženje kože, izsušenost, luščenje kože in vazodilatacijo. Poleg tega študije poročajo o možnem nastanku kontaktne urtikarije, če smo več mesecev izpostavljeni hlapom ksilenov koncentracije okoli 100 ppm (3). Meta-ksilen se lahko v obliki hlapov ali tekočine absorbira preko kože in povzroči nastanek dermatitisa (27). Opravljene so bile tudi raziskave o dermalni izpostavitvi laboratorijskih živali različnim koncentracijam ksilenom. Dermalni učinki meta-ksilena, orto-ksilena in mešanih ksilenov nastopajo tako pri nižjih, kot tudi pri višjih odmerkih. Nižji odmerki okoli 2,3 mg/kg so povzročili draženje kože z nastankom eritema in edema, medtem ko je pri višjih odmerkih nad 114 mg/kg prišlo do suhi krasti podobne tvorbe, ki nastane na koži kot posledica opekline ali delovanja jedke snovi (eschar) in epidermalne zadebelitve tkiva (3).

Poleg draženja sluznic, ksileni delujejo predvsem na osrednje živčevje. Zelo visoke koncentracije ksilenov povzročijo progresivno inhibicijo CŽS. Pojavi se zmedenost, ataksije, tremor, letargija, hiperrefleksija in hipertonus, kar se lahko nadaljuje z nezavestjo z ohlapnostjo mišičja in arefleksijo ali krči. Zaradi oslabljenega dihanja in neprekrvavljenosti možganskega tkiva lahko nastopi smrt.

Ker aromatski ogljikovodiki povzročajo senzibilizacijo miokarda na endogene in eksogene kateholamine, so mogoče tudi motnje srčnega ritma. Ob vdihovanju ksilenov je posameznik dispnoičen, kašlja, se duši, v nekaj urah pa se lahko pojavi pnevmonitis (24, 25, 26).

Klinične ugotovitve kažejo, da so ženske veliko bolj dovzetne za vplive, ki jih povzroča kratkotrajna izpostavitev ksilenom (27).

Tabela IV: Akutna toksičnost ksilenov (povzeto po 27)

Vrsta	Način izpostavitve	Količina odmerka	Učinek
Podgana	zaužitje vdihavanje	3500-8600 mg/kg	LD ₅₀
		28000-29,000 mg/m ³	LC ₅₀
		21000 mg/m ³	LC ₅₀
Miš	zaužitje vdihavanje	5300-5600 mg/kg	LD ₅₀
		23000 mg/m ³	LC ₅₀
		20000 mg/m ³	LD ₅₀
		17000 mg/m ³	LC ₅₀
	oči	1,8 mL/kg	LD ₅₀
Zajec	koža oči	14,1 mL/kg 13,8 mg	LD ₅₀ draženje, poškodbe roženice, itd.
Človek	zaužitje	15 mL	potencialno letalni odmerek
	vdihavanje	860 mg/m ³	draženje oči, nosa, itd.
		>870 mg/m ³	bruhanje, vrtoglavica, izguba kordinacije, itd.
		43000 mg/m ³	nezavest, potencialno smrtno

Legenda: LD₅₀: 50% letalna doza, LC₅₀: 50% letalna koncentracija

1.4.2 Dolgotrajna izpostavljenost in kronični učinki

Pri dolgotrajni izpostavljenosti ksilenom pride do poškodb osrednjega živčevja. Razvije se kronična encefalopatija s funkcijskimi motnjami, hkrati pa lahko pride tudi do poškodb ledvic in jeter (24, 25).

Nekateri ljudje so zaradi načina dela vsakodnevno izpostavljeni lahko nizkim ali pa tudi zelo visokim koncentracijam ksilena, pa čeprav v kratkem časovnem obdobju. Zaradi zelo visokih koncentracij ksilena (10.000 ppm) v kratkem časovnem obdobju lahko ljudje tudi umrejo. Številni učinki, ki nastanejo ob izpostavitvi, so lahko posledica tudi sočasne izpostavitve številnim spojinam, ki se skupaj s ksileni nahajajo v zraku ali v telesu izpostavljene osebe (3).

Mejna dovoljena izpostavljenost v 8 urnem (MDK) delavniku znaša 221 mg/m^3 ali 50 mL/m^3 (ppm), faktor kratkotrajne izpostavljenosti (KTV) pa 2. Vrednosti sta predpisani v Pravilniku o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu (25, 28).

1.4.3 Genotoksičnost in mutagenost ksilenov

Glede genotoksičnosti ksilenov so bile opravljene številne študije, vendar pa je na razpolago omejeno število podatkov, ki bi dokazovali genotoksičnost ksilenov pri ljudeh, tako po dermalni in oralni izpostavitvi, kot pri izpostavitvi preko inhalacije. Prav tako so študije opravljene na poizkusnih živalih (podgane, miši), ki so bile ksilenom izpostavljene na vse tri načine, izključile potencialno genotoksičnost ksilenov.

Edini pozitiven rezultat se nanaša na DNK fragmentacijo kot posledico dermalne izpostavitve podgan ksilenom, kar je povzročilo celično smrt. Podganam so dermalno aplicirali $250 \mu\text{L}$ (1200 mg/kg) meta-ksilena v eni uri. Nastenek DNK fragmentacije je sovpadal s histopatološko evidenco draženja in vnetja kože, kot tudi s poškodbami in odstopom epidermisa in dermisa.

Raziskave opravljene s pomočjo *in vitro* in *in vivo* testov (bakterije, kvasovke, kultivirane celice sesalcev, miši, podgan in ljudi), ki so se nanašale na mutagenost ksilenov, so podale zanesljive rezultate o nemutagenosti ksilenov.

Tako lahko trdimo, da so mešani ksileni, kot tudi vsi trije njegovi izomeri, nemutageni (3).

1.4.4 Kancerogenost ksilenov

Organizacije, kot so Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer-IARC), Ameriška vladna konferenca za industrijsko higieno (American Conference of Governmental Industrial Hygienists- ACGIH), Nacionalni toksikološki program (National Toxicology Program- NTP, ZDA) in Agencija za zaščito okolja (EPA, ZDA), so opredelile ksilene v skupino 2B, kot potencialno kancerogene spojine za ljudi (povečano tveganje za nastanek raka pri ljudeh, niso pa dokazano kancerogeni) (30, 31).

1.4.5 Repruduktivna toksičnost ksilenov

Ena izmed epidemioloških študij je pokazala, da lahko izpostavljenost ksilenom na delovnem mestu poveča možnost spontanega splava. Študije na živalih so pokazale, da se ksileni absorbirajo preko matere, prehajajo skozi placento in tako vplivajo na zarodek. Novorojeni mladiči, ki so bili tekom razvoja v materi izpostavljeni vplivom ksilenov, kažejo motnje v orientaciji in motoriki (3).

1.4.6 Nevrotoksičnost ksilenov

Večina opravljenih študij, ki so se izvedle na ljudeh in živalih, je bila osredotočenih na vedenjske učinke ksilenov. Podatki kažejo na razvoj encefalopatije ali nevropatije povzročene zaradi delovanja teh topil (3).

1.4.7 Ekotoksičnost ksilenov

Ksileni so specifično lažji od vode in zraka. So biološko razgradljivi, slabo pa se razgrajujejo pri anaerobnih pogojih. Hitro se oksidirajo na zraku. V vodnih sistemih povzročijo znižanje količine kisika tako, da BPK_5 (biološka potreba po kisiku v 5 dneh) znaša $0,98 \text{ O}_2/\text{mg}$. Raziskave vpliva na okolje niso zaznale bioakumulacije ksilenov.

Ksileni so strupeni za ribe, nevretenčarje in alge. LD_{50} za ribe (96 ur) znaša 1-10 mg/L, za vodne bakterije, za katere so ksileni rahlo strupeni pa 10-100 mg/L.

Izlitje ksilenov v pitno vodo povzroči njen neuporanost. Po določilih EPE (ZDA) o varni količini tovrstnih kemikalij v pitni vodi in glede na trenutno tehnologijo, sredstva in zmožnosti javnih vodovodnih sistemov za odkrivanje ksilenov v pitni vodi, najvišja dopustna

koncentracija onesnaževalcev (MCL) znaša 10 ppm. MCL v bioloških čistilnih napravah je bila določena na 1 mg/L (29, 42).

1.5 METODE DOLOČANJA KSILENOV

1.5.1 Določanje ksilenov v humanih bioloških vzorecih

Določanje metabolitov ksilena v bioloških tkivih in tekočinah (kri, urin, izdihan zrak) omogoča le omejeno število analitičnih metod.

Metabolite ksilenov lahko določamo s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC/MS), plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC/FID), tankoplastno kromatografijo (TLC) in visoko ločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

Metodi GC/FID in GC/MS ponujata možnost odlične analitične občutljivosti za direktno določitev metabolitov ksilena v urinu, krvi, tkivu kot tudi v izdihanem zraku. V kombinaciji ustreznega detektorja se poveča občutljivost in ločljivost posameznih izomerov ksilenov, predvsem v smislu ločevanja meta- in para- izomerov ksilena (3).

Metoda HPLC je občutljiva in specifična, hkrati pa tudi dovolj preprosta avtomatizirana analitska metoda, primerna za direktno določanje orto-, meta- in para-metil hipurnih kislin v urinu (3).

Preprosta in hitra analitična metoda je tudi sklopljena analizna metoda tekočinske kromatografije, ki nam omogoča učinkovito ločitev zmesi, in masne spektrometrije, ki nam poda kvalitativne in kvantitativne informacije o neki spojini v kompleksnem vzorcu. Ko je metoda sklopljena z MS, ki ima dva analizatorja, jo poimenujemo LC/MS/MS. Metoda je zelo občutljiva in selektivna, pri kateri je z ustrezeno ionizacijo možna analiza tako polarnih, kot nepolarnih spojin, kot tudi hlapnih oz. nehlapnih. Primerna je za določitev metabolitov ksilena v vzorcu urina, pri čemer loči posamezne izomere, vendar ne najbolje. Meja kvantifikacije za posamezni analit pa znaša manj kot 30 ng/mL (37, 41).

Tudi metoda tankoplastne kromatografije je preprosta v izvedbi in ponovljiva. Razvita je bila z namenom odkrivanja in ločitve predvsem meta- in para-metil hipurne kisline. Slabost metode je, da je analitična izvedba dolgotrajna, poleg tega pa sredstva oz. kemikalije, ki se uporablajo za vizualizacijo (npr. p-dimetilamino benzaldehid v ocetni kislini) dražijo oči in

sluznico. V različnih opravljenih raziskavah znaša občutljivost metode 6 µg hipurne kisline v 1 mL urina.

Po priporočilih Nacionalnega inštituta za varovanje zdravja (NOISH, ZDA) se priporoča odvzem urinskega vzorca preiskovancem po dveh dneh izpostavljenosti ksilenom ob koncu delovnika. Vzorce urina zberemo v 10 mL plastično epruveto in centrifugiramo na 4000 obratih (rpm)/5 min. Vzorec odlijemo od sedimenta in dodamo nekaj kristalov timola.

Vzorci urina so lahko shranjeni pri 4 °C, če se analiza izvede v enem tednu. Če opravljamo analizo kasneje, morajo biti vzorci shranjeni na najmanj -20 °C in so stabilni najmanj šest mesecev (3).

30-dnevna študija stabilnosti hipurnih kislin v sintetičnem vzorcu urina (Uni subTM, CST Technologies, Great Neck, NY) je pokazala, da so hipurne kisline stabilne sedem dni pri 22 °C in trideset dni pri 4 °C. Analiza stabilnosti v 24 urah je zagotovila izredno temperaturno stabilnost hipurnih kislin v območju od -20 °C do 30 °C. Prav tako so ugotovili, da ultrazvočna obdelava vzorca ne vpliva na stabilnost prisotnih hipurnih kislin v urinu (5).

Environmental Health Laboratory Sciences Division of the National Center for Environmental Health (NCEH) razvija metode za določitev ksilena in ostalih hlapljivih organskih spojin v krvi. Metodi visoko resolucijske plinske kromatografije in masne spektrometrije omogčata mejo detekcije v nivoju števila masnih ali volumskih delov izbrane snovi v trilijonu delov raztopine ali zmesi (ppt) (3).

1.5.2 Določanje ksilenov v okolju

Ksilene lahko določamo tudi v vzorcih zraka, v odpadni in pitni vodi, kot tudi v različnih zemeljskih sedimentih.

Določanje ksilenov v okoljskih vzorcih zahteva ustrezne varnostne ukrepe v smislu pravilnega zbiranja, priprave in shranjevanja ksilena v vzorcu. Pomembna je preprečitev izgube hlapljive spojine iz analitskega vzorca.

Najpogosteje uporabljena analitska metoda je sklopljena plinska kromatografija z ustreznim detektorjem. Izbiramo lahko med MS, fotoionizacijskim (PID), plamensko ionizacijskim (FID) detektorjem ali uporabimo ELCD detektor.

Plinska kromatografija s FID, MS ali ELCD detektorjem, se najpogosteje uporablja za analizo ksilena v zraku in vodi (odpadni kot tudi pitni). GC z ELCD ali PID pa se pogosteje uporablja pri analizi ksilena v zemeljskih sedimentih. GC/PID je primerna za analizo kompleksnega sistema, kot so izpušni plini, ki vsebujejo plinsko fazo ogljikovodikovih spojin, kot tudi ksilenov. Omogoča merjenje prisotnosti spojin v vzorcu (ksilenov) v nivoju števila masnih ali volumskih delov izbrane snovi v bilijonu delov raztopine ali zmesi (ppb). Omejitev metode je nepopolna ločba meta- in para-ksilena. GC/PID v tandemu s FID predstavlja zelo občutljivo metodo za določitev ksilenov v zraku. Meja detekcije znaša $1,3 \times 10^{-12}$ g orto-ksilena v posameznemu vzorcu. Prednost sistema GC/FID je, da se celoten krog analize ponovi v desetih sekundah, para-ksilen pa detektiramo v koncentraciji 13,4 ppb. Metoda GC sklopljena z MS je bila razvita v namen detekcije ksilena v odpadnih vodah. Sposobna je detekcije posameznih izomerov ksilena z mejo detekcije v koncentraciji 0,2 ppb (3).

Metode, ki se uporabljajo za določitev prisotnosti ksilenov in njihovih razpadnih produktov v okoljskih vzorcih, služijo za opredelitev onesnaženih območij (3).

1.5.3 Osnove kromatografije

Kromatografija je fizikalno kemijska metoda namenjena za ločevanje zmesi na njihove komponente. Temelji na različni afiniteti sestavin zmesi do stacionarne in do mobilne faze, ki je posledica različnih fizikalno kemijskih lastnosti posameznih sestavin vzorca. Interakcije, ki potekajo med sestavinami vzorca in stacionarno fazo (včasih tudi z mobilno fazo), so lahko na osnovi adsorbcije, porazdelitve, ionske izmenjave ali biološke afinitete. Glede na mobilno fazo razlikujemo med plinsko (GC), tekočinsko (LC) in superkritično-tekočinsko kromatografijo (SFC). Po izbiri stacionarne faze je kromatografija lahko adsorpcijska (GSC, LSC), porazdelitvena (GLC, LLC), ionsko-izmenjevalna (IEC), izključitvena (SEC) in afinitetna. Izvajamo jo lahko na koloni (izvedba na stolpcu stacionarne faze), na tankih plasteh plošč stacionarne faze (planarna-npr. tankoplastna), v kapilarah (na aktivnih površinah v tankih kapilarah).

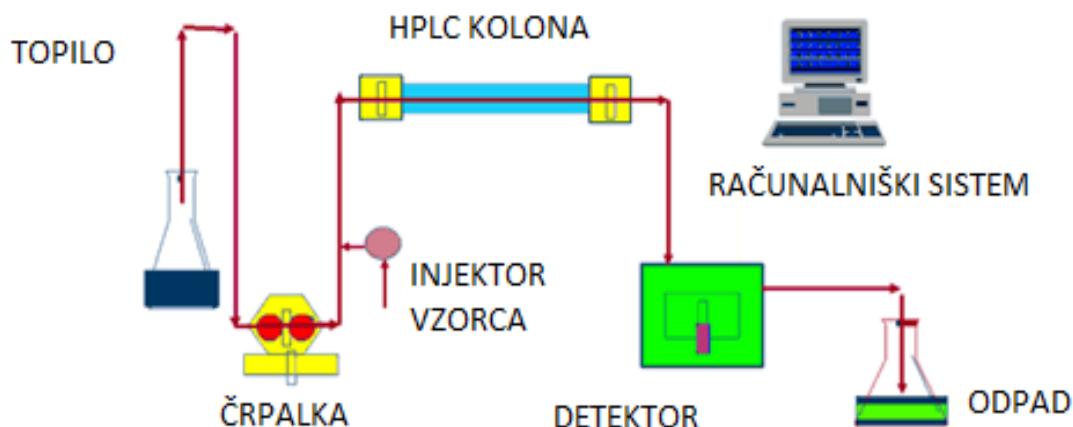
Kolonsko kromatografijo delimo na ionsko izmenjevalno, gelsko, afinitetno, hidrofobno, FPLC, HPLC, UHPLC (32).

1.5.4 HPLC-tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HPLC je ena od kromatografskih metod, namenjena ločevanju snovi na njihove komponente. Kromatografski sistem je sestavljen iz mobilne in stacionarne faze, ki se nahajata v koloni ter vzorca. Stacionarna faza je sestavljena iz majhnih delcev velikosti 3-20 μm , kar zagotavlja učinkovito ločevanje. Za vzdrževanje zadovoljivega pretoka mora biti mobilna faza konstantno izpostavljena visokim pritiskom, ki dosega do 400 barov.

Sistem HPLC sestoji iz rezervoarja za mobilno fazo, črpalke (ki z določenim pretokom skozi kolono poganja mobilno fazo), sistema za injiciranje (s katerim vbrizgamo vzorec v kolono) in kromatografske kolone (na kateri poteka ločevanje). Te komponente sistema služijo separaciji.

Drugi del sistema sestoji iz enega ali več detektorjev (s katerimi zaznamo prihod komponent iz kromatografske kolone in kvantitativno ovrednotimo posamezne komponente), programske opreme za vrednotenje odziva in rezervoarjev za odpadna topila.



Slika 5: Shema HPLC kromatografskega sistema (povzeto po 32).

Mobilne faze, ki se uporabljajo, se razlikujejo glede na vrsto stacionarne faze. Pri absorpcijski/normalno fazni porazdelitveni HPLC se uporablja za mobilno fazo n-heksan, metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril. Pri reverzno-fazno porazdelitveni le to predstavljajo močna topila in vodne puferske raztopine, kot so metanol, acetonitril, THF, izopropanol. Možna je uporaba šibkih topil, ki vsebujejo še reagente za tvorbo ionskih parov,

in soli za večanje ionske moči. Mobilno fazo pri ionsko-izmenjevalni kromatografiji predstavljajo vodne puferske raztopine, kisline, baze, pri izločitveni kromatografiji pa največkrat THF in kloroform.

Mobilna faza je lahko sestavljena iz enega samega topila, lahko pa predstavlja zmes močnega in šibkega topila. Močno topilo je tisto, ki retencijske čase skrajša, šibko pa jih podaljša. Sestava mobilne faze je lahko stalna (izokratska analiza) ali pa se med analizo spreminja (gradientna).

Reverzno-fazna HPLC zahteva uporabo manj strupenih topil, s čimer je zmanjšano onesnaževanje okolja in izpostavljanje analitika nevarnim snovem. Kot najpogosteje uporabljeno mobilno fazo pri tej kromatografiji predstavlja mešanica vode in organskega modifikatorja, ki se meša z njo, običajno metanola ali acetonitrila.

Tok mobilne faze nosi molekule vzorca skozi kolono s stacionarno fazo. Zaradi različnih sposobnosti porazdelitve med stacionarno oz. mobilno fazo, imajo molekule v vzorcu različno hitrost potovanja. Molekule, ki so bolj polarne (reverzno-fazna porazdelivena HPLC), imajo nižjo afiniteto do stacionarne faze. Zato se eluirajo prve. Večja kot je afiniteta stacionarne faze in molekul v vzorcu, kasneje se eluirajo iz sistema. Pri reverzno-fazni porazdelitveni HPLC se manj polarne molekule bolj intenzivno porazdelijo v stacionarno fazo, zato so njihovi retencijski časi daljši. Pri reverzno-fazni porazdelitveni kromatografiji igra pomembno vlogo tudi ustrezna izbira pufra. pH mobilne faze ne sme biti enak pKa analita. Optimalno je, če se razlikuje za dve pH enoti. Večina reverzno-faznih stacionarnih faz je stabilna pri pH pogojih 2-7,5 (32, 33, 34).

Mobilna faza se s pomočjo črpalke črpa konstantno, natančno in s ponovljivo hitrostjo v separacijski sistem. Eden izmed najbolj kritičnih korakov pri HPLC je injiciranje vzorca. V idealnem primeru le ta doseže kolono v obliki majhne kapljice, pri kateri ne pride do difuzije, ki bi razširila kromatografske vrhove in poslabšala ločljivost. Pred vnosom na kolono degazer iz mobilne faze odstrani ostanke plinov, da ne bi tvorili mehurčke, ki bi motili detekcijo ter zanesljivost analize. Željeno je filtriranje mobilne faze skozi membrane z velikostjo por največ $0,5 \mu\text{m}$, z namenom odstranitve morebitnih prisotnih delcev.

Najpogosteje uporabljeni stacionarni fazi pri reverzno-fazni HPLC je silikagel, ki ima kovalentno vezane hidrofobne verige ogljikovodikov. Shranjena je v koloni dolžine 15-25 cm,

ki je izdelana iz nerjavečega jekla, plastike ali stekla. Opremljena je s termostatom ali s sistemi za ogrevanje oz. hlajenje kolon.

V kombinaciji s HPLC se uporablajo številni detektorji, ki temeljijo na tipu analize, ki jo želimo izvesti (kvantitativna ali kvalitativna). Detektor mora biti visoko občutljiv, univerzalen in specifičen, ima široko linearno območje odziva in daje stabilen odziv pri izbrani temperaturi in hitrosti pretoka (33, 34).

HPLC je preprosta, občutljiva in specifična avtomatizirana analitska metoda za direktno določanje orto-, meta-, para-metil hipurnih kislin in orto-, meta-in para-ksilenov.

Možno pomanjkljivost metode predstavljajo prenizke koncentracije ($< 0,6 \text{ mg/L}$) v urinu in napačno izbrana mobilna faza, (npr. acetonitrila in 1 % fosforne kisline), ker ni sposobna razlikovati med presnovnimi metaboliti ksilenov in strukturno sorodnimi spojinami (benzen, toluen) (3).

1.5.5 Validacija HPLC metode

Validacija je sistematično dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da metoda z visoko stopnjo zanesljivosti zagotavlja rezultate, ki točno odražajo lastnosti preiskovanega vzorca. Z validacijo zagotovimo zanesljivost, kakovost in doslednost HPLC rezultatov (35).

1.5.5.1 Linearost

Metoda je linearна, ko daje znotraj določenega intervala odzive, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami prenosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Opredelimo jo z metodo linearne regresije tako, da določimo umeritveno premico z enačbo: $y = kx + n$. Spremenljivka y predstavlja odziv (površina kromatografskega vrha analita ali razmerje površine kromatografskega vrha analita in IS), x je koncentracija analita v vzorcu, k naklon premice in n odsek na ordinati. Umeritvena premica opisuje odnos med koncentracijo analita in odziva. Korelacijo med spremenljivkama ovrednotimo s Pearsonovim koreacijskim koeficientom (r) oz. determinacijskim koeficientom (r^2).

Za določitev umeritvene krivulje in linearnosti se priporoča uporaba vsaj šestih standardnih vzorcev in slepi vzorec. Vsaj štirje od šestih vzorcev, vključno s standardom pri spodnji meji kvantifikacije (LLOQ) in pri najvišji koncentraciji, mora po izračunu njihove koncentracije iz

umeritvene premice odstopati manj kot 15 % od nominalne koncentracije oz. manj kot 20 % pri LLOQ. V nasprotju metoda ne ustrezja FDA amernicam glede linearnosti.

1.5.5.2 Točnost

Točnost metode odraža ujemanje dobljene vrednosti s pravo, referenčno vrednostjo. Določamo jo z analizo kontrolnih vzorcev znane koncentracije (vsaj tri različne koncentracije kontrolnih vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, z vsaj petimi ponovitvami pri posamezni koncentraciji). Iz odziva vsakega kontrolnega vzorca s pomočjo umeritvene premice izračunamo njegovo koncentracijo (z in brez upoštevanja IS). Sledi izračun povprečja petih ponovitev pri posamezni koncentraciji in primerjava z dejansko (referenčno) vrednostjo. Povprečna vrednost mora odstopati manj kot 15 % od dejanske vrednosti oz. manj kot 20 % pri LLOQ.

1.5.5.3 Ponovljivost

Ponovljivost je natančnost znotraj postopka. Izraža stopnjo ujemanja analitskih rezultatov dobljenih med serijo analiz istega vzorca pod točno določenimi pogoji. Določamo jo z analizo kontrolnih vzorcev znane koncentracije analita (z vsaj tremi različnimi koncentracijami kontrolnih vzorcev, ki pokrivajo celotno območje in vsaj petimi ponovitvami pri vsaki koncentraciji). Ponovljivost lahko izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variance (CV). Koeficient variance petih ponovitev vsake koncentracije kontrolnega vzorca ne sme preseči 15 % oz. 20 % pri LLOQ. Ponavadi določamo znotrajdnevno in meddnevno (vsaj tri dni) ponovljivost.

1.5.5.4 Območje analize

Je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, kateremu so bili dokazani točnost, ponovljivost in linearnost. Območje analizne metode določimo iz območja linearnosti.

1.5.5.5 Meja kvantifikacije

Spodnja meja kvantifikacije/limite (LLOQ) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko z našo metodo še zanesljivo, kvantitativno ovrednotimo z ustrezeno točnostjo in

natančnostjo. Po FDA smernicah je to najnižja točka (standard) na umeritveni premici, ki sovpada danim pogojem:

- Odziv standarda pri LLOQ je vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca
- Odziv standarda pri LLOQ mora ustrezati pogojem točnosti in ponovljivosti (80 med 120 % za točnost in $CV \leq 20\%$).

1.5.5.6 Selektivnost

Selektivnost analizne metode odraža njeno sposobnost, da ob prisotnosti drugih, strukturno in kemijsko sorodnih (kot tudi nesorodnih) komponent za katere domnevamo, da so prisotne v našem vzorcu (sestavine matriksa, metaboliti, različne učinkovine..), zanesljivo analizira le željeni analit. Kromatografski vrha analita ne sme vsebovati drugih komponent vzorca. To potrdimo s predhodno analizo vsaj šestih različnih slepih vzorcev. Tako pri retencijskemu času našega analita ne sme biti interferenčnih vrhov.

1.5.5.7 Robustnost analitske metode

Je sposobnost metode, da le ta zaradi majhnih, a namernih razlik v parametrih ostane neprizadeta. Je merilo zanesljivosti med običajno uporabo metode. Definirana je s stopnjo reproducibilnosti rezultatov dobljenih z analizo istih vzorcev pri različnih pogojih (različnih laboratorijsih). Določimo jo tako, da primerjamo rezultate pri spremenjenih pogojih z rezultati pri normalnih pogojih analize.

1.5.5.8 Postpreparativna stabilnost vzorcev

Gre za določitev stabilnosti vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku. Vzorce je potrebno analizirat v treh paralelkah v različnih časovnih zaporedjih pod enakimi temperaturnimi pogoji.

2. NAMEN DELA

Ljudje smo vsakodnevno izpostavljeni velikemu številu kemikalji v okolju. Med njimi jih je veliko, ki so izredno obstojne in hlapljive. V človeško telo vstopajo preko dihal, kože ali z zaužitjem. Lahko se metabolizirajo preko različnih poti in se v obliki presnovkov ali nespremenjene prerazporedijo tako, da ustvarijo določeno koncentracijsko ravnotesje med telesnimi tekočinami in tkivi (npr. krvno plazmo, maščobnim tkivom, materinim mlekom, itd.).

Namen naloge je določiti prisotnost metabolitov ksilenov v urinu kot posledico poklicne izpostavljenosti in ovrednotiti razlike v koncentracijah metabolitov pri posameznih preiskovancih glede na obdobje dela v histološkem in citološkem laboratoriju. Upoštevali bomo dejavnike, ki bi lahko vplivali na rezultate izpostavljenosti (odsotnost z delovnega mesta, bolezen, menstrualni cikel, uživanje alkohola, itd.).

Za določanje zgoraj omenjenih analitov smo izbrali HPLC metodo, katere razvoj bo potekal v več korakih. Najprej bomo optimizirali kromatografsko ločbo. Izbrali bomo ustrezno kolono, interni standard, določili optimalno sestavo mobilne faze, pretok mobilne faze in temperaturo kolone. Tako bomo zagotovili dobro resolucijo preiskovanih analitov in zagotovili čim krajši čas analize.

Metodo bomo validirali po FDA smernicah o validaciji bioanaliznih metod za biološke vzorce. Tako bomo potrdili, da je naša metoda zanesljiva in ustrezna za analizo ksilenov v urinu. FDA določa naslednje parametre validacije: linearnost, točnost, natančnost (ponovljivost), selektivnost, robustnost, območje in mejo kvantifikacije, ter uspešnost ekstrakcije in postpreparativno stabilnost (36).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material

Za analizo smo uporabili humane urinske vzorce zaposlenih preiskovancev v histološkem in citološkem laboratoriju Oddelka za patologijo, Splošne bolnišnice Celje. Biološki material preiskovancev je bil pridobljen po zaključenem delavniku. Biološki material kot kontrolni vzorec smo pridobili s pomočjo 3B LAB diagnostičnega laboratorija (Vodnikova ulica 3, 3000 Celje). Zaradi upoštevanja številnih dejavnikov, npr. bolezni, menstrualnih ciklov, dopustov, smo odvzem pri preiskovancih izvedli v dveh časovnih obdobjih (27.6.-8.7. in 8.8.-12.8.2011). V analizo je bilo vključenih:

- šest preiskovancev iz histološkega (5 žensk in 1 moški) in dva iz citološkega laboratorija (2 ženski). Pri preiskovancih 1, 2 in 3 smo izvedli šest odvzemov biološkega materiala (dva tedna), pri preiskovancih 4, 5, 6, 7 in 8, pa po tri odvzeme (en teden)
- vzorci 1, 2, 3, 4, 5 in 6, so preiskovanci histološkega laboratorija, vzorca 7 in 8 pa iz citološkega laboratorija
- vzorci preiskovancev so bili odvzeti po zaključenem delavniku
- sedem kontrolnih vzorcev (5 žensk in 2 moška), enkraten, naključen odvzem.

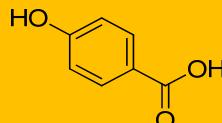
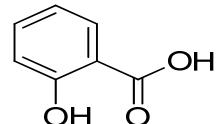
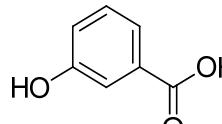
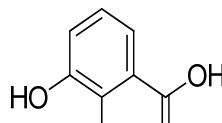
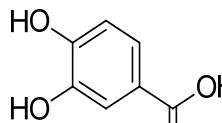
Preiskovanci so bili v času testiranja relativno zdravi (brez posebnih znakov kakršnega koli obolenja), niso bili na dieti in niso uživali alkohola ter prepovedanih drog. Vzorci urina preiskovancev so bili zbrani po zaključenem delavniku in shranjeni do analize na -70 °C. Kontrolni vzorci so bili zbrani naključno tekom dneva in do analize shranjeni na -70 °C.

3.1.2 Standardi

Tabela V : Izbrani standardi

Št. standarda	Ime	MW(g/mol)	Proizvajalec in stopnja čistoče	Strukturna formula
Standard 1	Hipurna kislina $C_9H_9NO_3$	179,17	99 %,Sigma- Aldrich, Steinheim, Nemčija	
Standard 2	N-(o-toluidil) glicin $CH_3C_6H_4CONHCH_2COOH$	193,2	$\geq 98 \%$,TCI Evropa	
Standard 3	N-(m-toluidil) glicin $C_{10}H_{11}NO_3$	193,2	$\geq 98 \%$,TCI Evropa	
Standard4	N-(p-toluidil) glicin $C_{10}H_{11}NO_3$	193,2	$\geq 98 \%$,TCI Evropa	

Tabela VI : Nabor preiskušenih internih standardov (IS)

Št. standarda	Ime	MW(g/mol)	Proizvajalec in stopnja čistoče	Strukturna formula
Interni standard 1	4-hidroksi benzojska kislina $C_7H_6O_3$	138,12	99 %,Sigma- Aldrich, Steinheim, Nemčija	
Interni standard 2	2-hidroksi benzojska kislina $C_7H_6O_3$	138,12	99 %,Sigma- Aldrich, Steinheim, Nemčija	
Interni standard 3	3-hidroksi benzojska kislina $C_7H_6O_3$	138,12	99 %,Sigma- Aldrich, Steinheim, Nemčija	
Interni standard 4	2,3-dihidroksi benzojska kislina $C_7H_6O_4$	154,12	$\geq 97 \%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, ZDA	
Interni standard 5	3,4-dihidroksi benzojska kislina $C_7H_6O_4$	154,12	$\geq 97 \%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, ZDA	

Interni standard 6	4-hidroksi-3-nitrobenzojska kislina $C_7H_5NO_5$	183,12	$\geq 98 \%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, ZDA	
Interni standard 7	3-hidroksi-4-nitrobenzojska kislina $C_7H_5NO_5$	183,12	$\geq 97 \%$, Maybridge, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, ZDA	
Interni standard 8	3-amino benzojska kislina $C_7H_7NO_2$	137,14	99 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, ZDA	
Interni standard 9	INA-12-p2 $C_{10}H_8N_2O_5$	-	na FFA	
Interni standard 10	Acetil salicilna kislina $C_9H_8O_4$	180,16	na FFA	

Opombe: Preiskušali smo deset IS; krepko označena vrstica prikazuje izbran IS.

3.1.3 Reagenti in topila

- Metanol, CH₃OH, MW= 32,04 g/mol (HPLC Gradient Grade, J.T.Baker, Nizozemska)
- Etanol, C₂H₅OH, MW= 46,07 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Acetonitril, C₂H₃N, MW= 41,05 g/mol (HPLC Gradient Grade, J.T.Baker, Nizozemska)
- Trifluoroocetna kislina, 99 %, C₂HF₃O₂, MW= 114,02 g/mol (Acros Organics, New Jersey, ZDA)
- 1 M klorovodikova kislina, HCl, MW= 36,46 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Dietil eter, C₄H₁₀O, MW= 74,12 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Bidestilirana voda: ultra čista voda pridobljena z aparatom Milli Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA) na Fakulteti za farmacijo.

3.1.4 Naprave in instrumentalni pribor

- HPLC sistem: Agilent tehnologies 1100 series s 4-kanalno črpalko, avtomatskim vzorcevalnikom in UV detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- HPLC koloni: Eclipse plus C18, 5 µm, 150×4,6 mm, (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija) in Phenomenex Kinetex C18, 2,6 µm, 100×4,6 mm (Phenomenex inc., Torrance, ZDA)
- Zmrzovalnik -70°C MDF-U50V (Sanyo Eletric Biomedical, Japonska)
- Analitska tehtnica AG 245 (Mettler Toledo International inc., Greinfansee, Švica)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Centrifuga Centric 150 (Tehnica Železniki d.o.o, Železniki, Slovenija)
- Stekleni inventar: merilne bučke (Hirschman, Nemčija), merilni valji (Duran, Nemčija), steklene čaše (Schott Duran, Nemčija), tehtiči, viale, penicilinke, polnilne pipete.
- Ostali laboratorijski pribor: polavtomatske pipete in nastavki (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija), celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija), zaščitna sredstva (zaščitna halja, rokavice).

3.2 Metode

3.2.1 Postopki priprave in izbire raztopin standardov

3.2.1.1 Priprava raztopine posameznega standarda za analizo metabolitov ksilena v vzorcu urina

Osnovne raztopine naših standardov smo pripravili v koncentraciji 1 mg/mL tako, da smo posamezni standard zatehtali v ustrezni masi (25 mg) na tehtič in ga kvantitativno prenesli v 25 mL volumetrično bučko. Razapljaljali smo v raztopini acetonitrila in vode v razmerju 4:1.

Tabela VII: Mase zatehtanih standardov

Standard	Masa (mg)
Hipurna kislina (1)	25
<i>N</i> -(o-toluidil) glicin (2)	25
<i>N</i> -(m-toluidil) glicin (3)	25
<i>N</i> -(p-toluidil) glicin (4)	25

3.2.1.2 Izbira internega standarda

Izbirali smo med desetimi internimi standardi. Le te smo preizkušali v različnih koncentracijah in jih razapljaljali v različnih topilih in redčili v pufru. Za razapljanje smo preiskusili mešanico metanola in vode (4:1) ter acetonitrila in vode (4:1).

- Interni standard št. 2 smo pripravili s koncentracijo 1,0 mg/mL v raztopini acetonitrila in H₂O (80 % : 20 %) in ga dodatno redčili v razmerju 1:10 v 0,1 % TFA.
- Interni standard št. 3 smo pripravili s koncentracijo 1 mg/mL v MeOH in H₂O in s koncentracijo 10 mg/ml v raztopini acetonitrila in H₂O (80 % : 20 %). Raztopino IS št.3 z višjo koncentracijo smo dodatno redčili v razmerju 1:10 v 0,1 % TFA (raztopina dest. H₂O in trifluoroacetne kisline).
- Interne standarde št. 1, 4 in 5 smo pripravili s koncentracijo 10 mg/mL v raztopini acetonitrila in H₂O (80 % : 20 %) in jih dodatno redčili v razmerju 1:10 v 0,1 % TFA.
- Interne standarde št. 6, 7, 8 in 11 smo pripravili s koncentracijo 1,0 mg/mL v raztopini acetonitrila in H₂O (80 % : 20 %) in jih dodatno redčili v razmerju 1:10 v 0,1 % TFA.

Interni standard smo izbrali na osnovi dveh kriterijev:

- Dobre resolucije kromatografskih vrhov preiskovane sestavine napram vrhovom, ki izvirajo iz biološkega vzorca urina,
- čim krajši retencijski čas, da po nepotrebnem ne podaljšamo časa analize. Idealno je, če se IS eluira iz kolone pred našimi preiskovanimi sestavinami.

3.2.2 Priprava urinskih vzorcev

3.2.2.1 Priprava realnih urinskih vzorcev

Uporabili smo 500 µL urinskega vzorca in ga odpipetirali v 15 mL stekleno epruveto. Dodali smo 50 µL IS (1 mg/mL), 25 µL 0,1 M HCl in 3 mL dietil etra. Vse skupaj smo dobro premešali in dobili dve ločeni faz. Zgornjo fazo topila smo odpipetirali v stekleno penicilinko in posušili do suhega. Topili smo v raztopini acetonitrila in 0,1 % TFA (20 % : 80 %). Raztopino smo dobro premešali v ultrazvočni kadički in preko celuloznega filtra za HPLC prenesli v vialo.

3.2.2.2 Priprava urinskih vzorcev za razvoj metode

Uporabili smo 500 µL slepega urinskega vzorca in ga odpipetirali v 15 mL stekleno epruveto. Dodali smo 50 µL posebej pripravljene t.i. spike raztopine, ki je vsebovala ustrezne koncentracije posameznih standardov, 25 µL 0,1 M HCl, 50 µL in 3 mL dietil etra. Vse skupaj smo dobro premešali in dobili dve ločeni faz. Zgornjo fazo topila smo odpipetirali v stekleno penicilinko in posušili do suhega. Topili smo v raztopini acetonitrila: 0,1 % TFA (20 % : 80 %). Raztopino smo dobro premešali v ultrazvočni kadički in preko celuloznega filtra za HPLC prenesli v vialo.

Tabela VIII: Koncentracije standardov in IS

Standardi	Koncentracija (mg/mL)
4-hidroksi benzojska kislina	1
Hipurna kislina	0,1
<i>N</i> -(o-toluidil) glicin	0,1
<i>N</i> -(m-toluidil) glicin	0,1
<i>N</i> -(p-toluidil) glicin	0,1

3.2.3 Razvoj kromatografske metode (HPLC)

3.2.3.1 Izbera kolone

Preizkusili smo dve različni kromatografski koloni (obe reverznofazni):

- Eclipse plus C18, 5 μ m, 150 \times 4,6 mm, (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija)
- Phenomenex Kinetex C18, 2,6 μ m, 100 \times 4,6 mm (Phenomenex inc., Torrance, ZDA)

Pri posamezni koloni smo preučevali njen vpliv na dolžino (čas) analize, resolucijo vrhov preiskovanih analitov v vzorcu urina in internega standarda.

3.2.3.2 Razvoj optimalne mobilne faze

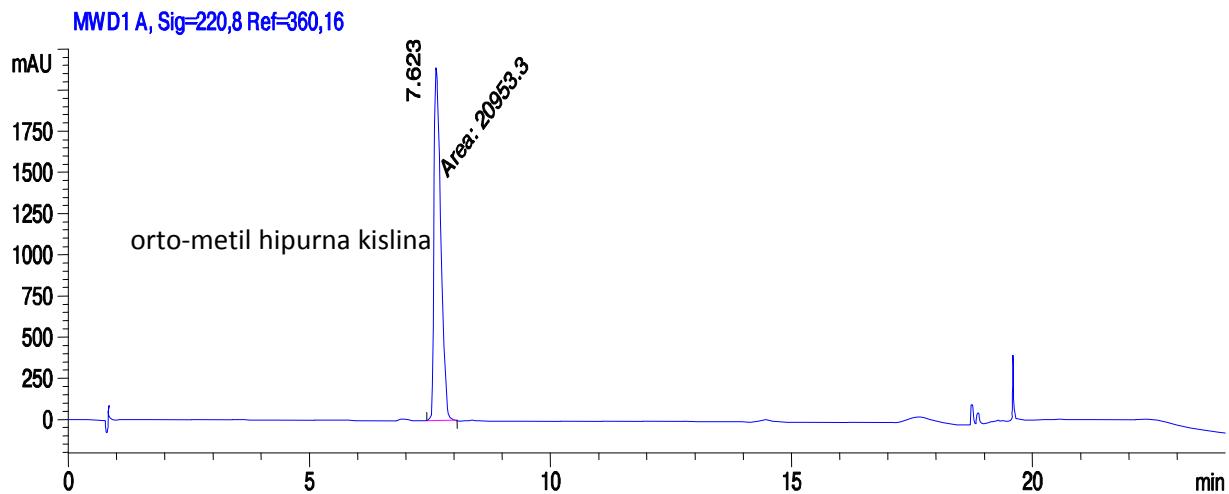
Kot vodni del mobilne faze smo v vseh primerih uporabili 0,1 % TFA v ultra čisti destilirani H₂O.

Kot organski del mobilne faze smo preiskusili metanol in acetonitril.

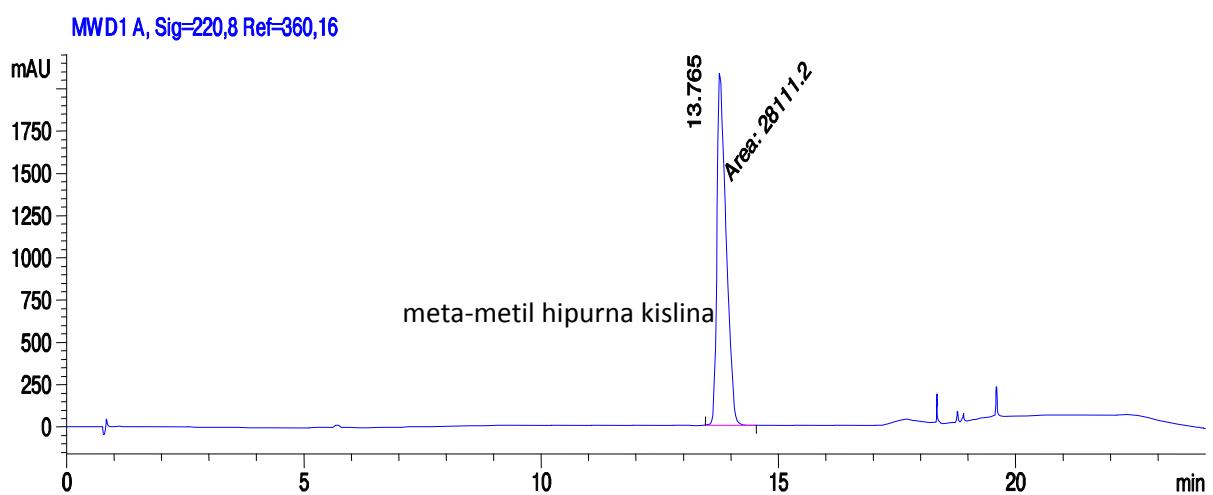
Sočasno smo preizkušali različne gradiante (odstotek dela mobilne faze se tekom analize spreminja) mobilne faze (tako metanola kot acetonitrila) v različnih časovnih območjih:

- MeOH in 0,1 % TFA iz 30 \rightarrow 70 % v 15min
- MeOH in 0,1 % TFA iz 25 \rightarrow 50 % v 15min
- Acetonitril in 0,1 % TFA iz 24 \rightarrow 40 % v 15min
- Acetonitril in 0,1 % TFA iz 10 \rightarrow 30 % v 6 min
- Acetonitril in 0,1 % TFA iz 10 \rightarrow 21 % v 12 min
- Acetonitril in 0,1 % TFA iz 5 \rightarrow 10 % v 15 min
- Acetonitril in 0,1 % TFA iz 5 \rightarrow 10 % v 12 min

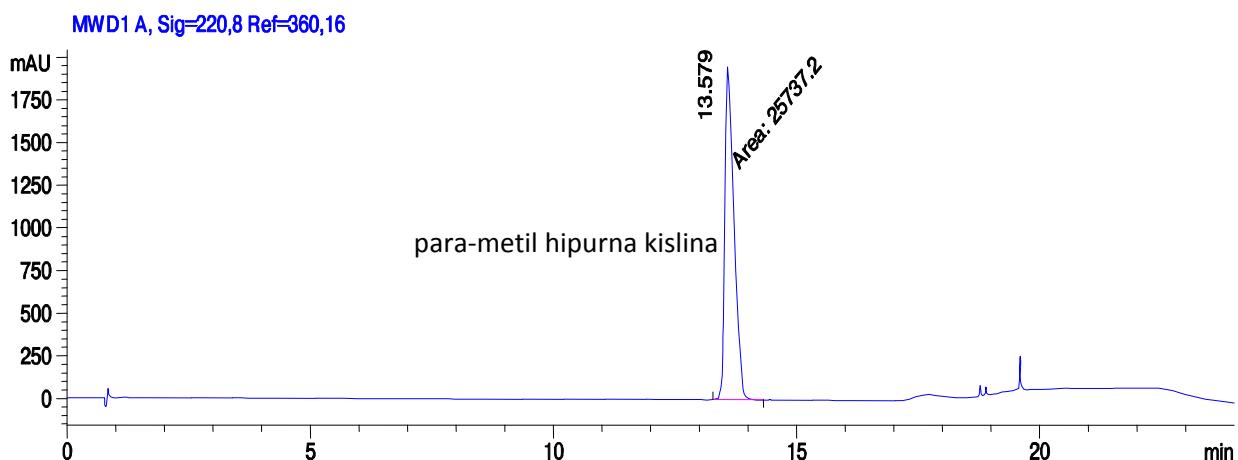
Pri gradientu acetonitrila in 0,1 % TFA iz 5 \rightarrow 10 % v 15 min smo analizirali retencijske čase IS in posameznega standarda.



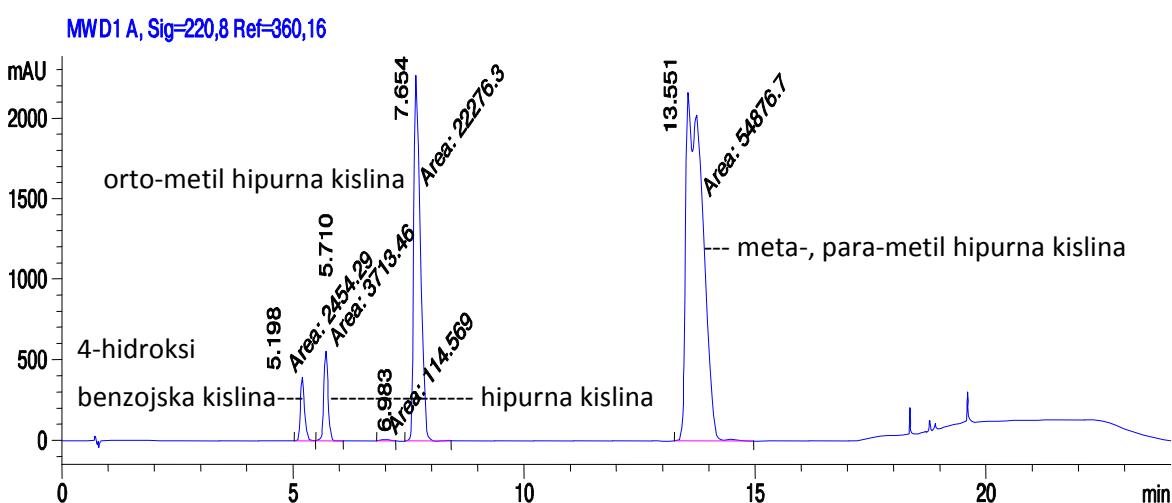
Slika 6: Retencijski čas orto-metil hipurne kisline pri 5→10 % gradientu acetonitrila in 0,1 % TFA v 15 min.



Slika 7: Retencijski čas meta-metil hipurne kisline pri 5→10 % gradientu acetonitrila in 0,1 % TFA v 15 min.



Slika 8: Retencijski čas para-metil hipurne kisline pri 5→10 % gradientu acetonitrila in 0,1 % TFA v 15 min.



Slika 9: Retencijski časi IS in posameznega standarda pri 5→10 % gradientu acetonitrila in 0,1 % TFA v 15 min. (Opomba: Retencijski čas pri 5,19 min pripada IS (4- hidroksi benzojski kislini), retencijski čas pri 5,71 min pa standardu hipurne kisline.)

3.2.3.3 Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

Preizkušali smo pretoke mobilne faze v območju 1,0-1,5 mL/min.

3.2.3.4 Izbira optimalne temperature kolone

Preizkusili smo temperature kolone v območju 25-40 °C.

3.2.3.5 Izbira optimalne valovne dolžine za detekcijo signala

Kromatograme smo posneli pri različnih emisijskih valovnih dolžinah: 210, 220, 230 in 254 nm.

Pri razvoju same HPLC metode (izbiri kolone, mobilne faze, pretoka temperature kolone in pogojev detekcije) smo se osredotočili predvsem na dva pomembna kriterija in sicer na dolžino analize in resolucijo oz. uspešno ločbo vrhov preiskovanih analitov in internega standarda v vzorcu urina.

3.3 Validacija metode

3.3.1 Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo

V tehtih smo zatehtali 25 mg izbranega internega standarda (IS) in ga s pomočjo raztopine acetonitrila in 0,1 % TFA (4:1) kvantitativno prenesli v 25 mL volumetrično bučko. Bučko smo s pomočjo raztopine acetonitrila in 0,1 % TFA dopolnili do oznake in raztopili s pomočjo ultrazvoka.

Prav tako smo pripravili posamezni standard. Natančno smo zatehtali 25 mg posameznega standarda in ga s pomočjo raztopine acetonitrila in 0,1 % TFA (4:1) kvantitativno prenesli v 25 mL volumetrično bučko. Dopolnili smo do oznake in dobro raztopili s pomočjo ultrazvoka.

Tako smo si pripravili osnovno raztopino. Za pripravo raztopin za določanje območja linearnosti smo morali pripraviti še raztopino 1 in 2. Pripravili smo ju tako, da smo v 10 mL volumetrično bučko za raztopino 1 odpipetirali 1mL osnovne raztopine IS in trikrat po 1mL osnovne raztopine posameznih standardov ter razredčili z raztopino acetonitrila in 0,1 % TFA.

Raztopino 2 smo pripravili tako, da smo v 10 mL volumetrično bučko odpipetirali trikrat po 1 mL raztopine 1 posameznih standardov in redčili z raztopino acetonitrila in 0,1 % TFA.

Pripravili smo devet standardnih raztopin v 10 mL volumetričnih bučkah v različnih koncentracijah:

- Priprava raztopine 1: 1mL IS + 3 x 1 mL S
- Priprava raztopine 2: 1mL IS + 3 x 0,5 mL S
- Priprava raztopine 3: 1mL IS + 3 x 0,2 mL S
- Priprava raztopine 4: 1mL IS + 3 x 1 mL S (raztopina 1)
- Priprava raztopine 5: 1mL IS + 3 x 0,5 mL S (raztopina 1)
- Priprava raztopine 6: 1mL IS + 3 x 0,2 mL S (raztopina 1)
- Priprava raztopine 7: 1mL IS + 3 x 0,5 mL S (raztopina 2)
- Priprava raztopine 8: 1mL IS + 3 x 0,2 mL S (raztopina 2)
- Priprava raztopine 9: 1mL IS + 3 x 0,05 mL S (raztopina 2)

Tabela IX: Priprava standardnih raztopin za določanje območja linearnosti (končne koncentracije v $\mu\text{g/mL}$)

Raztopina	Konc.(IS)	Konc.(HK)	Konc. (o-metil HK)	Konc. (m-,p-metil HK)
1	100	100	100	100
2	100	50	50	50
3	100	20	20	20
4	100	10	10	10
5	100	5	5	5
6	100	2	2	2
7	100	0,5	0,5	0,5
8	100	0,2	0,2	0,2
9	100	0,05	0,05	0,05

Legenda: HK: hipurna kislina, o-HK: orto-metil hipurna kislina, m-, p-HK: meta-, para-metil hipurna kislina

3.3.2 Priprava standardnih raztopin za določitev točnosti metode

Najprej smo pripravili osnovno raztopino IS v koncentraciji 1 mg/mL (natančno smo zatehtali 100 mg IS in ga prenesli v 100 mL volumetrično bučko, kjer smo ga raztopljal v raztopini acetonitrila in 0,1 % TFA ter dopolnili do oznake). IS smo dobro raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke.

Nato smo v ustreznih koncentracijah pripravili standardne raztopine. Natančno smo zatehtali 50 mg posameznega standarda in ga raztopljal v 25 mL volumetrični bučki s pomočjo raztopine acetonitrila in 0,1 % TFA in dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke. Koncentracija vseh standardov je znašala 2 mg/mL.

Tabela X: Osnovni raztopini standardov

Volumetrična bučka	Vsebina
A	1 mg/mL IS
B	2 mg/mL S+1 mg/mL IS

Za določitev točnosti ekstrakcije smo pripravili osem standardnih raztopin v 10 mL volumetrične bučke, različnih koncentracij:

- Priprava raztopine 1: 10 mL vsebine B
- Priprava raztopine 2: 5,0 mL vsebine B, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 3: 2,5 mL vsebine B, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 4: 1,0 mL vsebine B, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 5: 0,5 mL vsebine B, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 6: 1,0 mL razt. 3, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 7: 0,5 mL razt. 3, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A
- Priprava raztopine 8: 1,0 mL razt. 5, bučko dopolnimo do oznake z vsebino A

Tabela XI: Priprava standardnih raztopin za določanje točnosti ekstrakcije (končne koncentracije v $\mu\text{g/mL}$)

Raztopina	Konc.(IS)	Konc.(HK)	Konc. (o-metil HK)	Konc. (m-,p-metil HK)
1	1000	2000	2000	2000
2	1000	1000	1000	1000
3	1000	500	500	500
4	1000	200	200	200
5	1000	100	100	100
6	1000	50	50	50
7	1000	25	25	25
8	1000	10	10	10

Legenda: HK: hipurna kislina, o-HK: orto-metil hipurna kislina, m-, p-HK: meta-, para- metil hipurna kislina

3.3.3 Ponovljivost in postpreparativna stabilnost vzorcev

Uspešnost ekstrakcije v kontrolnem urinskem vzorcu za posamezni analit smo določili iz razmerja odziva (površine pod vrhom) posameznega analita napram IS pri dveh različnih koncentracijah (300 in 100 $\mu\text{g/mL}$). Delali smo v treh paralelkah.

Vzorce smo pripravili tako, da smo 500 μL urina dodali 25 μL HCl + 50 μL IS in 50 μL spike raztopine ustrezne koncentracije (300 in 100 $\mu\text{g/mL}$). Nadaljni postopek je enak opisu pod 3.2.2.1.

Izhajali smo iz t.i. spike raztopine, katere koncentracija je znašala 500 $\mu\text{g/mL}$ in je vsebovala vse standarde (tabela V).

Postpreparativno stabilnost vzorcev smo sočasno določili v avtomatskem vzorčevalniku. Vzorce različnih koncentracij smo v treh paralelkah analizirali v času 0, po 4 in 10 dneh (23.9., 27.9. in 3.10.) Ves čas so bili vzorci v avtomatskem vzorčevalniku izpostavljeni temperaturi 25 °C. Opazovali smo spremembo odziva posameznih metabolitov.

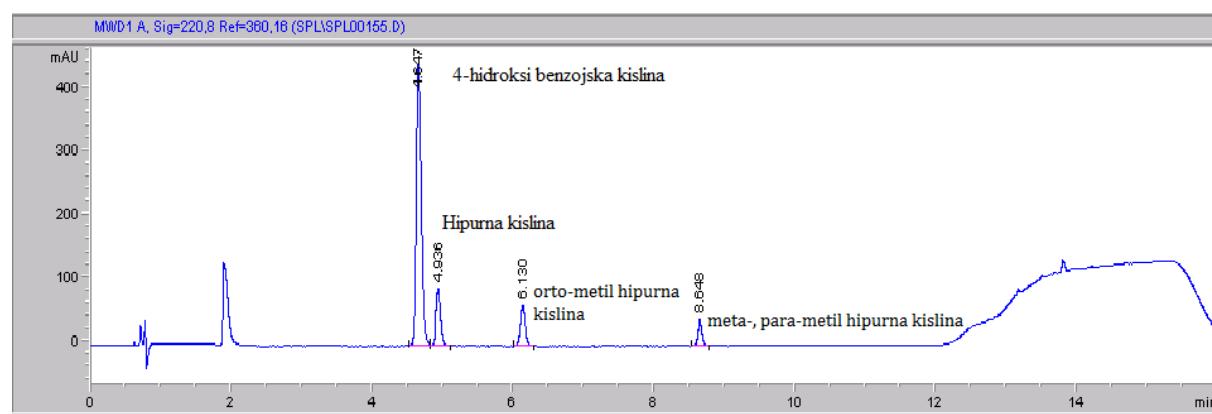
3.3.4 Aplikacija metode na realne urinske vzorce

Metodo smo aplicirali na realne urinske vzorce preiskovancev, ki so vsakodnevno zaradi narave in načina strokovnega dela izpostavljeni vplivom ksilena in jih primerjali s kontrolnimi vzorci.

4. REZULTATI

4.1. Izbira internega standarda

Kot najboljši IS se je izkazala 4-hidroksi benzojska kislina, saj se je njen kromatografski vrh popolnoma ločil od preiskovanih sestavin v vzorcu urina. Iz kolone se je eluirala pred vsemi tremi oblikami metabolitov ksilenov (erto, meta in para) kar posledično ni podaljševalo časa analize. Ostali IS (2-hidroksi benzojska kislina, 2-acetil sailicilna kislina, INA..) so se eluirali kasneje in nam podaljševali čas analize ter se prekrivali s preiskovanimi sestavinami.



Slika 10: Kromatogram izbranega internega standarda in posameznih standardov.

4.2. Razvoj kromatografske metode (HPLC)

Izbira kolone

Izbrali smo kolono Phenomenex Kinetex C18, 2,6 µm, 100×4,6 mm (Phenomenex inc., Torrance, ZDA), saj smo z njo dosegli najboljšo ločbo (resolucijo) vrhov posameznih analitov in internega istandarda ter relativno kratek čas analize. Kljub zadovoljivima resolucijama IS in orto-metil hipurne kisline, nam ni popolnoma uspelo ločiti meta- in para-metil hipurne kisline.

Ugotavljanje optimalne mobilne faze

Preiskusili smo veliko različnih sestav mobilne faze in gradientov (odstotek organskega dela mobilne faze se med analizo zvezno spreminja), kot je opisano v poglavju 3.2.3.2.

Optimalna mobilna faza je sestavljena:

- 90 % vodnega dela: 0,1 % TFA
- 10 % organskega dela: acetonitril

Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

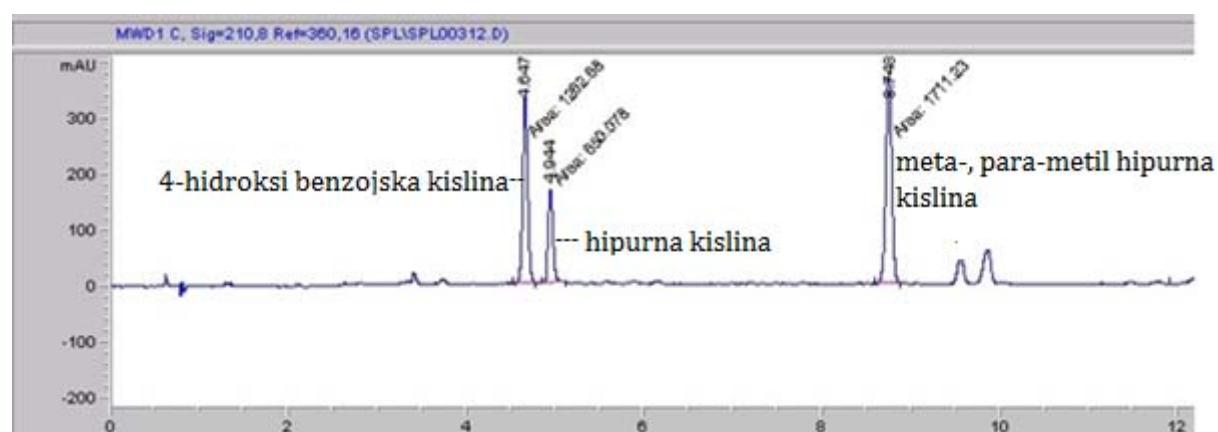
Zaradi izbrane kolone smo izbrali pretok 1,5 mL/min.

Izbira optimalne temperaturo kolone

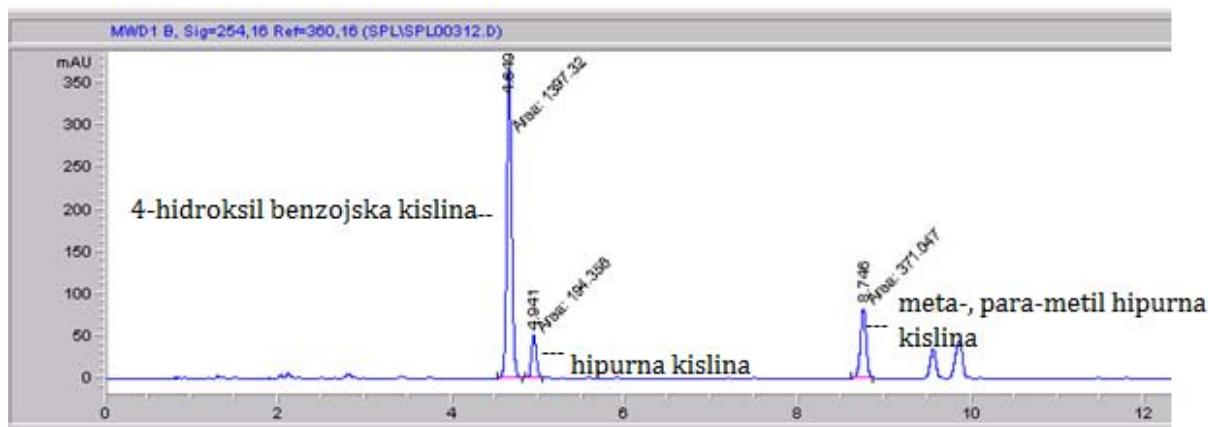
Izbrali smo temperaturo 25 °C, saj smo z njo dosegli najboljšo ločbo vrhov analitov in internega standarda ter relativno kratek čas analize.

Izbira ustrezne valovne dolžine

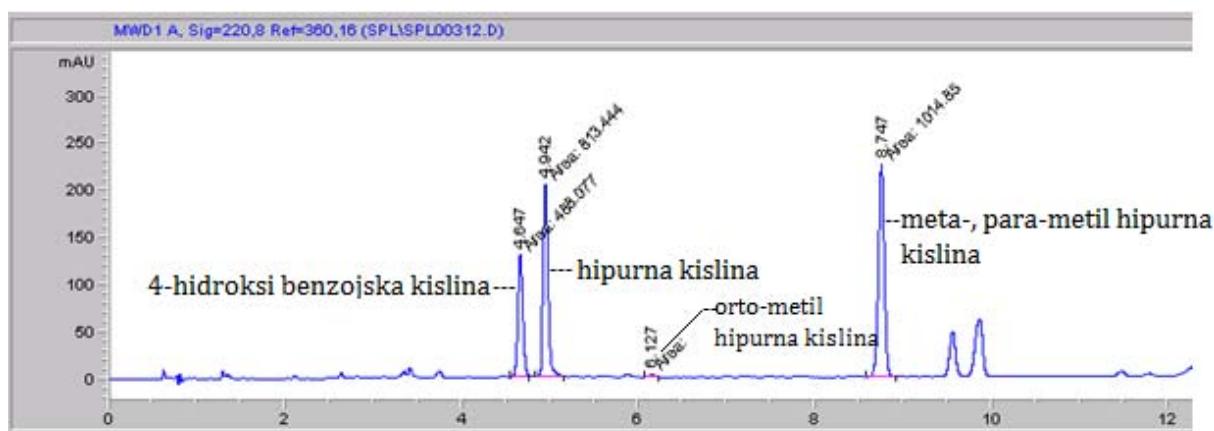
Pri izbrani metodi HPLC smo se odločili za UV detekcijo. Tako smo za odčitavanje kromatogramov izbrali valovno dolžino 210 nm, saj so bile pri tej valovni dolžini absorbcije vseh analitov primerljive, hkrati pa je bila metoda dovolj občutljiva.



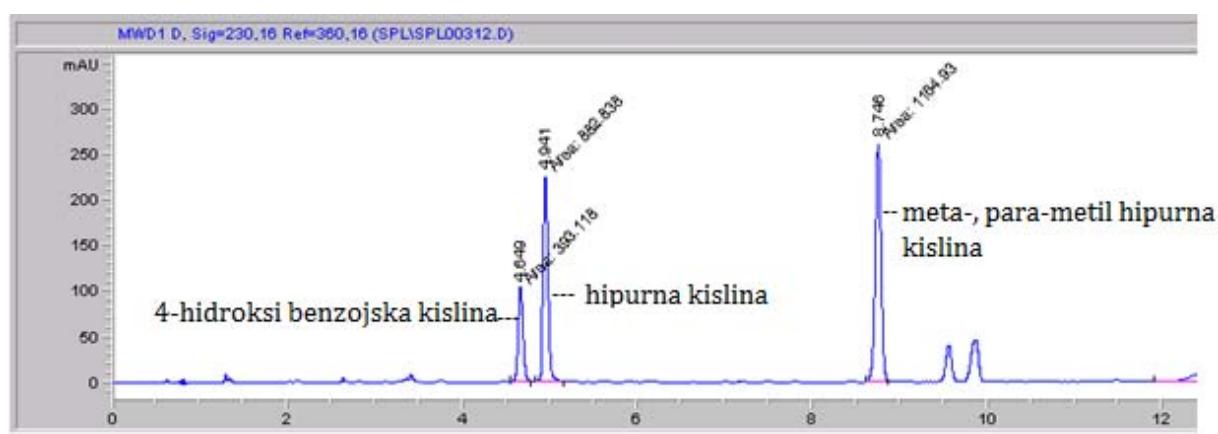
Slika 11: Kromatogram izomerov ksilenov in IS pri valovni dolžini 210 nm.



Slika 12: Kromatogram izomerov ksilenov in IS pri valovni dolžini 254 nm.



Slika 13: Kromatogram izomerov ksilenov in IS pri valovni dolžini 220 nm.



Slika 14: Kromatogram izomerov ksilenov in IS pri valovni dolžini 230 nm.

4.3. Končna optimizirana HPLC metoda

Priprava urinskega vzorca in ekstrakcija:

K 500 µL preiskovančevega in kontrolnega urina v 15 mL stekleni epruveti dodamo 25 µL 1M HCl in 50 µL IS (4-hidroksi benzojske kislina) s koncentracijo 1 mg/mL. Zmesi dodamo 3 mL dietil etra in dobro premešamo. Dobimo dve dobro ločeni fazi. Zgornjo odpipetiramo in sušimo do suhega. Razapljamamo v raztopini acetonitrila in 0,1 % TFA (80 % : 20 %) in dobro premešamo s pomočjo ultrazvočne kopeli. Tako pripravljen vzorec s pomočjo celuloznega HPLC filtra odmerimo v vialo.

Metoda HPLC:

- *Kolona:* Phenomenex Kinetex C18, 2,6µm, 100×4,6 mm (Phenomenex inc., Torrance, ZDA)
- *Mobilna faza:* gradientna metoda
 - 90 % vodnega dela: 0,1 % TFA
 - 10 % organskega dela: acetonitril
- *Pretok mobilne faze:* 1,5 mL/min
- *Temperatura kolone:* 25 °C
- *Čas analize:* 12 min (čas celotne analize +(post time) =15min)
- *Valovna dolžina:* 210 nm

Tabela XII: Retencijski časi analitov in internega standarda

Spojina	Retencijski čas (min)
4-hidroksi benzojska kislina	4,647
Hipurna kislina	4,936
N (o-toluidil) glicin	6,130
N (m, p-toluidil) glicin	8,648

4.4. Validacija metode

Validacijo metode smo izvajali deset dni postopno po korakih, ki so predstavljeni pod točko 3.3.

4.4.1. Linearnost

Tabela XIII: Prikazuje odzive (AUC) posameznega standarda pri točno določeni vrednosti koncentracije

Konc. ($\mu\text{g/mL}$)	AUC (HK)	AUC (erto-metil HK)	AUC (meta-, para-metil HK)
2000	4378,8	3003,4	3228,5
1000	2655,2	1524,1	1730,1
500	1727,8	810,2	920,9
200	990,9	298,4	351,3
100	983,3	198,1	251,3
50	799,2	77,9	89,9
25	642,3	40,0	42,0
10	734,0	11,4	24,1

Iz podatkov smo določili enačbo za umeritveno krivuljo.

Tabela XIV: Enačbi orto-, meta- in para-metil hipurno kislino

	HK	erto-HK	meta, para-HK
Enačba	-	$y = 0,015x + 0,008$ $r^2 = 0,999$	$y = 0,016x + 0,031$ $r^2 = 0,999$

Umeritvene krivulje za hipurno kislino nismo določili iz razloga pojavnosti le te tudi pri kontrolnih vzorcih.

4.4.2. Točnost

Tabela XV : Odzivi IS pri večkratnih ponovitvah pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$

Konc. ($\mu\text{g/mL}$)	AUC (IS)
100	2453
100	2470
100	2417
100	2407
100	2418
100	2423
100	2427

100	2431
100	2392

Linearnost odziva IS smo določali pri koncentraciji 100 µg/mL, zato smo za nadaljni izračun razmerja posameznega S/IS vzeli povprečje odzivov IS, ki je znašalo 2426,4.

Tabela XVI: Odzivi posameznega standarda pri podani določeni koncentraciji

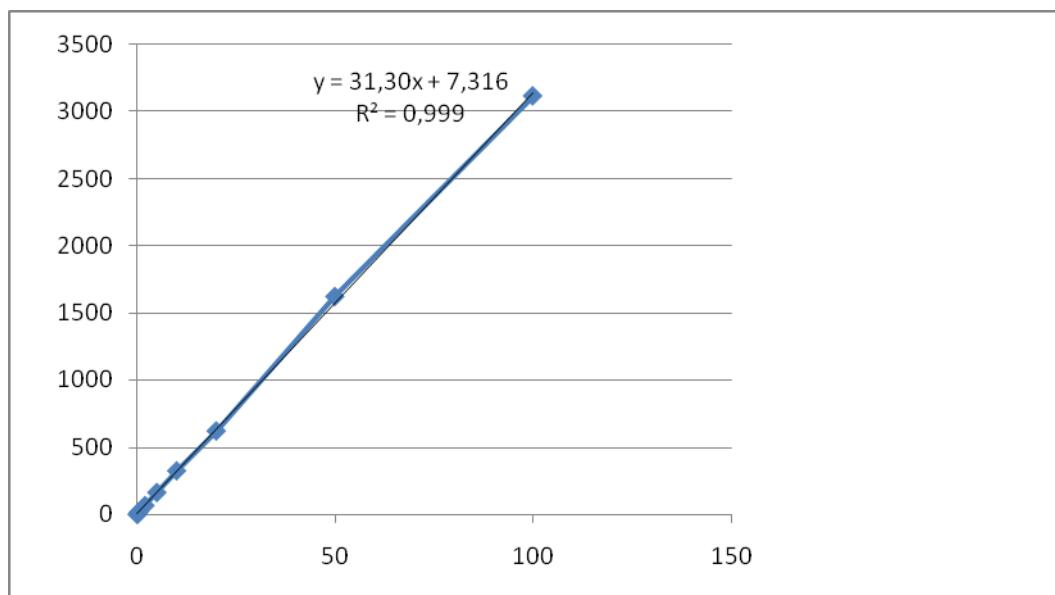
Konc. (µg/mL)	AUC (ortho-metil HK)	AUC (meta-, para-metil HK)
100	3114,8	2603,7
50	1621,9	1318,9
20	621,4	483,4
10	325,1	258,5
5	163,6	131,3
2	66,5	44,9
0,5	19,9	17,5
0,2	9,60	11,1
0,05	0	0

Iz posameznega odziva S in koncentracije smo izračunali razmerje posameznega S napram IS.

Tabela XVII: Prikaz razmerja med posameznim standardom in IS pri podani določeni koncentraciji

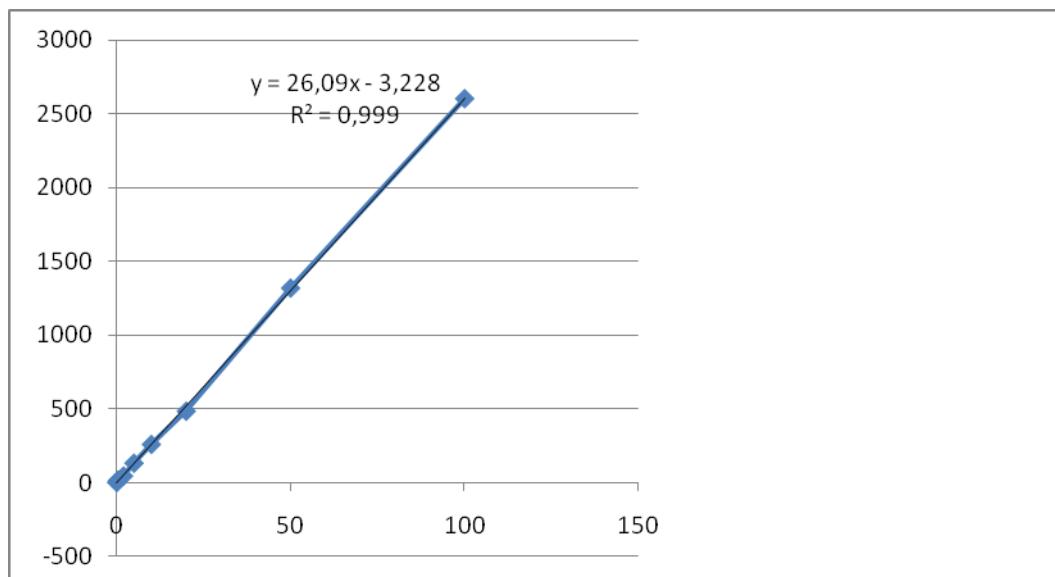
Konc. (µg/mL)	ortho-metil HK/IS	meta-, para-metil HK/IS
100	1,284	1,073
50	0,668	0,543
20	0,256	0,199
10	0,134	0,107
5	0,067	0,054
2	0,027	0,018
0,5	0,008	0,007
0,2	0,004	0,005
0,05	0	0

Na podlagi dobljenih odzivov smo določili enačbo umeritvene premice za primerjavo točnosti koncentracij posameznega S.



Legenda: x os: koncentracija orto-metil HK ($\mu\text{g}/\text{mL}$), y os: površina pod krivuljo (AUC)

Slika 15 : Enačba umeritvene premice za izračun koncentracije orto-metil hipurne kisline.



Legenda: x os: koncentracija meta-, para-metil HK ($\mu\text{g}/\text{mL}$), y os: površina pod krivuljo (AUC).

Slika 16 : Enačba umeritvene premice za izračun koncentracije meta-, para-metil hipurne kisline.

Tabela XVIII: Prikaz točnosti koncentracij orto-metil hipurne kisline

Konc. (µg/mL)	Konc. orto-metil HK iz umeritvene krivulje	Točnost (%)
100	99,3	99,3
50	51,6	103,2
20	19,6	98
10	10,2	102
5	4,99	99,8
2	1,89	94,5
0,5	0,40	80
0,2	0,07	35
0,05	0	0

Opomba: Koncentracije smo izračunali iz umeritvene premice, glede na nominalne koncentracije standarda z upoštevanjem IS.

Tabela XIX: Prikaz točnosti koncentracij meta-, para-metil hipurne kisline

Konc. (µg/mL)	Konc. meta-, para-metil HK iz umeritvene krivulje	Točnost (%)
100	99,9	99,9
50	50,7	101,4
20	18,7	93,5
10	10,0	100
5	5,16	103,2
2	1,80	90
0,5	0,80	160
0,2	0,50	250
0,05	0,10	200

Opomba: Koncentracije smo izračunali iz umeritvene premice, glede na nominalne koncentracije standarda z upoštevanjem IS.

Odebeljeni rezultati odstopajo več, kot je dovoljeno po FDA smernicah.

4.4.3. Ponovljivost

Za preiskovane analite smo določili znotrajdnevno ponovljivost metode z upoštevanjem IS.

Tabela XX: Prikazuje ponovljivost za določanje koncentracij orto-metil hipurne kisline

Konc.(µg/mL)	1.dan	4.dan	10.dan	Konc.(µg/mL)	1.dan	4.dan	10.dan
	orto-metil HK/IS	orto-metil HK/IS	orto-metil HK/IS		orto-metil HK/IS	orto-metil HK/IS	orto-metil HK/IS
300-A	2,29	2,28	2,28	100-A	0,82	0,80	0,81
300-B	2,24	2,20	2,23	100-B	0,82	0,81	0,81
300-C	2,31	2,27	2,28	100-C	0,83	0,81	0,81
Povprečje	2,28	2,25	2,26	Povprečje	0,82	0,81	0,81
SD	0,036	0,044	0,029	SD	0,006	0,006	0
CV(%)	1,58	1,94	1,28	CV(%)	0,7	0,72	0

Tabela: XXI: Prikazuje ponovljivost za določanje koncentracij meta-, para-metil hipurne kisline

Konc.(µg/mL)	1.dan	4.dan	10.dan	Konc.(µg/mL)	1.dan	4.dan	10.dan
	meta, para-metil HK/IS	meta, para-metil HK/IS	meta, para-metil HK/IS		meta, para-metil HK/IS	meta, para-metil HK/IS	meta, para-metil HK/IS
300-A	2,76	2,63	2,65	100-A	0,98	0,91	0,92
300-B	2,73	2,54	2,59	100-B	0,97	0,91	0,92
300-C	2,80	2,62	2,64	100-C	0,98	0,92	0,93
Povprečje	2,76	2,59	2,63	Povprečje	0,98	0,91	0,92
SD	0,035	0,049	0,032	SD	0,006	0,006	0,006
CV(%)	1,27	1,89	1,22	CV(%)	0,59	0,63	0,63

4.4.4. Območje

Območje analizne metode za standarde z upoštevanjem IS znaša 6,0-100 µg/mL.

4.4.5. Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije in mejo detekcije smo določili za določanje orto-metil hipurne kisline in celokupne meta-, para-metil hipurne kisline iz enačb umeritvenih premic z upoštevanjem IS. Mejo detekcije izračunamo kot trikratno vrednost standardnega odklona vrednosti odsekov na ordinati deljeno s standardnim naklonom premice, mejo kvantifikacije pa izračunamo kot desetkratno vrednost standardnega odklona vrednosti odsekov na ordinati deljeno s standardnim naklonom umeritvene premice.

Za določanje orto-metil hipurne kisline smo določili mejo detekcije 2,1 µg/mL in mejo kvantifikacije 6,9 µg/mL. Za določanje celokupne meta-, para-metil hipurne kisline pa smo določili mejo detekcije 1,8 µg/mL in mejo kvantifikacije 6,0 µg/mL.

4.4.6. Selektivnost

Z analizo sočasne aplikacije vseh treh standardnih vzorcev nam ni uspelo popolnoma ločiti meta- in para-metil hipurne kisline.

4.4.7. Aplikacija metode na realne vzorce urina

Analiza kontrolnih vzorcev št. 1-7 je pokazala prisotnost različnih metabolitov, ki so lahko posledica izpostavitve tudi drugim spojinam, ne samo ksilenom. Pri vseh kontrolnih vzorcih se pri času okoli 4,9 (retencijski čas) pojavlja vrh, ki najverjetneje pripada hipurni kislini (glede na primerjavo retencijskega časa standarda hipurne kisline, ki znaša 4,94). Kontrolni vzorci vsebujejo tudi druge metabolite (priloga 8, tabela 9), katere bi lahko identificirali z drugo analitično metodo, npr. GC/MS ali LC/MS.

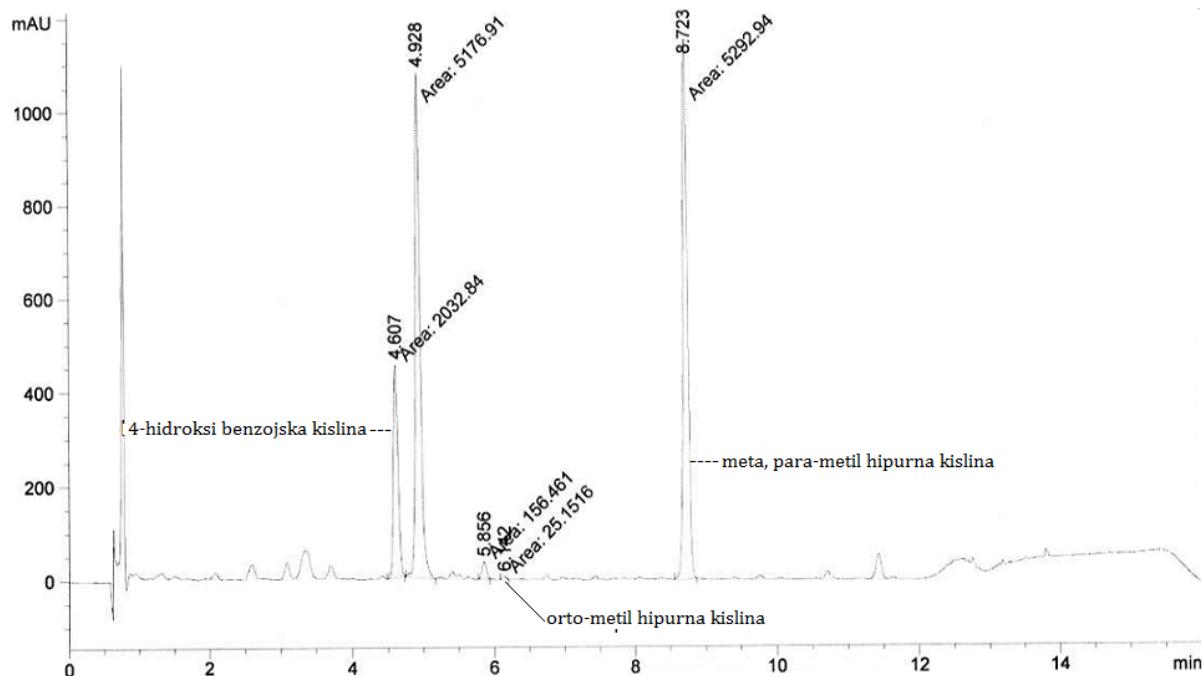
Tabela XXII: Retencijski časi morebitne hipurne kisline (HK) pri kontrolnih vzorcih

Kontrolni vzorec (št.)	Retencijski čas morebitne HK (min)
1	4,93
2	4,95
3	4,92
4	4,91
5	4,89
6	4,92
7	4,91

Spodnje tabele prikazujejo prisotne koncentracije orto-, meta- in para-metil hipurne kisline v urinu zaposlenih v histološkem in citološkem laboratoriju v dveh različnih časovnih obdobjih.

Tabela XXIII: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 1

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
1	$0,87 \pm 0,08$	$151,0 \pm 1,12$	27.6.
1	$1,28 \pm 0,13$	$313,6 \pm 2,09$	29.6.
1	$1,74 \pm 0,17$	$136,0 \pm 18,1$	1.7.
1	$0,39 \pm 0,01$	$9,46 \pm 0,08$	4.7.
1	$1,07 \pm 0,05$	$207,7 \pm 4,71$	6.7.
1	$2,96 \pm 0,25$	$584,4 \pm 19,5$	8.7.



Slika 17: Metaboliti ksilena pri preiskovancu 1 dne 27.6.12 (A).

Tabela XXIV: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 2

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
2	$0,49 \pm 0,04$	$89,4 \pm 4,15$	27.6.
2	-	$159,8 \pm 2,10$	29.6.
2	$1,08 \pm 0,08$	$242,9 \pm 1,42$	1.7.
2	$0,68 \pm 0,04$	$12,3 \pm 0,06$	4.7.
2	$0,89 \pm 0,14$	$96,6 \pm 8,11$	6.7.
2	$2,0 \pm 0,19$	$178,7 \pm 1,81$	8.7.

Opomba: 29.6. prenizka koncentracija orto-metil HK, zato jo nismo bili zmožni zaznati (ročno integriranje).

Tabela XXV: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 3

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
3	$0,66 \pm 0,32$	$113,2 \pm 1,45$	27.6.
3	$1,55 \pm 0,08$	$136,9 \pm 0,95$	29.6.
3	$0,22 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,17$	1.7.
3	$0,50 \pm 0,01$	$5,50 \pm 0,03$	4.7.
3	$0,94 \pm 0,01$	$97,7 \pm 2,10$	6.7.
3	$0,43 \pm 0,02$	$82,1 \pm 0,60$	8.7.

Tabela XXVI: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 4

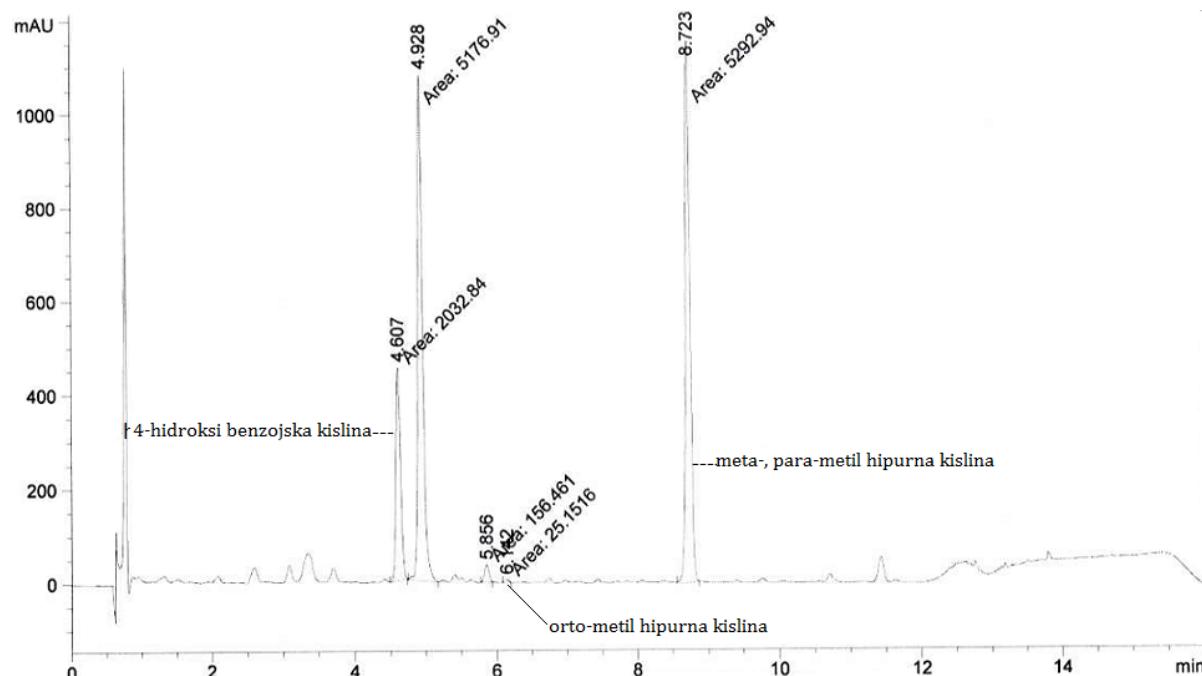
Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
4	$0,88 \pm 0,05$	$188,0 \pm 2,65$	27.6.
4	$1,96 \pm 0,09$	$194,4 \pm 1,07$	29.6.
4	$3,27 \pm 0,17$	$327,2 \pm 19,9$	1.7.

Tabela XXVII: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 5

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
5	$0,47 \pm 0,00$	$44,6 \pm 0,40$	8.8.
5	$0,47 \pm 0,02$	$26,9 \pm 0,98$	10.8.
5	$1,23 \pm 0,06$	$73,9 \pm 2,35$	12.8.

Tabela XXVIII: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 6

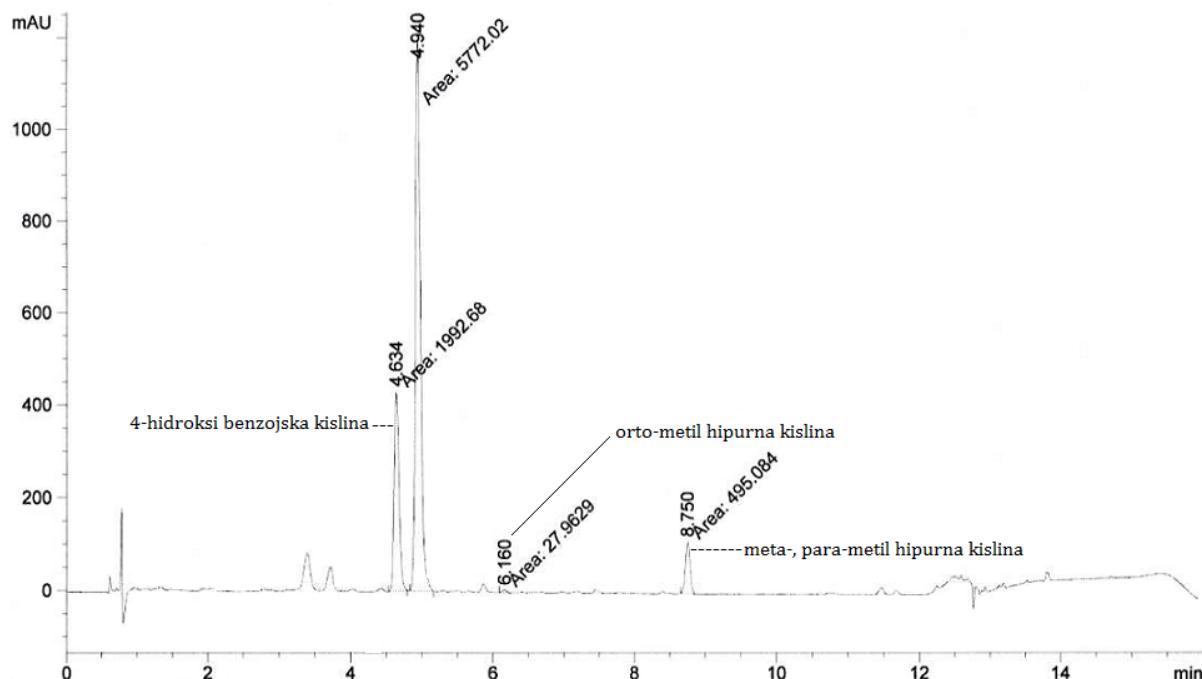
Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
6	$1,92 \pm 0,15$	$48,4 \pm 0,50$	8.8.
6	$1,58 \pm 0,05$	$44,9 \pm 1,36$	10.8.
6	$0,35 \pm 0,04$	$15,8 \pm 0,10$	12.8.



Slika 18: Metaboliti ksilena pri preiskovancu 6 dne 8.8.12 (B).

Tabela XXIX: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 7

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
7	$0,46 \pm 0,03$	$13,6 \pm 0,17$	8.8.
7	$0,85 \pm 0,07$	$14,7 \pm 0,32$	10.8.
7	$0,43 \pm 0,02$	$18,9 \pm 0,20$	12.8.



Slika 19: Metaboliti ksilena pri preiskovancu 7 dne 10.8.12 (C).

Tabela XXX: Vrednosti koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline pri vzorcu 8

Vzorec	Povp.konc. orto-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Povp.konc. meta, para-metil HK ($\mu\text{g/mL}$)	Datum
8	$1,57 \pm 0,04$	$32,3 \pm 0,10$	8.8.
8	$0,98 \pm 0,05$	$38,8 \pm 0,50$	10.8.
8	$2,78 \pm 0,41$	$47,5 \pm 1,01$	12.8.

5. RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo analizirali urin zaposlenih v histološkem in citološkem laboratoriju na prisotnost metabolitov ksilena. Preiskovanci so zaradi narave in načina dela dolgoletno izpostavljeni vplivom različnih kemikalj, vključno s ksileni. Razlog za izvedbo analize so bili tudi neustrezni pogoji dela na obeh deloviščih in sicer v smislu neustrezne ventilacije, odsesavanja, zaščitnih pregrad, odsotnosti digestorija in zaščitnih sredstev. Pri večini preiskovancev ni bil v času zaposlitve nikoli izveden biološki monitoring na izpostavljenost ksilenom. V analizo smo sočasno vključili še sedem kontrolnih urinskih vzorcev.

Ksileni so ena izmed osnovnih vrst organskih topil, ki se uporablajo v histološkem in citološkem laboratoriju v stopnjah priprave biološkega materiala (kot predhodnja stopnja barvanju citoloških brisov in deparafinizacija tkivnih rezin ekscizatov, resekcij, abrazij, itd.).

V nalogi smo razvili HPLC metodo z UV detekcijo, ki je omogočala ustrezeno in optimalno analizo preiskovanih metabolitov ksilena v vzorcih urina.

Najpomembnejši in hkrati tudi najtežji del magistrske naloge je predstavljal sam razvoj kromatografske metode. Cilj je bil doseči ustrezeno ločbo (resolucijo) kromatografskih vrhov vseh standardov in IS, sočasno pa smo morali zagotoviti, da čas analize ni bil predolg. Kot najboljši IS se je izkazala 4-hidroksi benzojska kislina, saj se je njen kromatografski vrh popolnoma ločil od preiskovanih sestavin v vzorcu urina. Iz kolone se je eluirala pred vsemi oblikami metabolitov ksilenv, kar posledično ni podaljševalo časa analize.

Najboljšo ločbo analitov smo dosegli z uporabo kolone Phenomenex Kinetex C18, 2,6 µm, 100×4,6 mm. Primerjali smo jo s kolono Eclipse plus C18, 5 µm, 150×4,6 mm, vendar smo s prvo dosegli ustrezejšo ločbo in zagotovili krajiši čas analize. Odločili smo se za gradientno metodo. Veliko časa smo posvetili izbiri ustrezne sestave mobilne faze. Višji kot je bil odstotek acetonitrila, krajiši so bili retencijski časi in slabša ločba. Za optimalno mobilno fazo se je izkazala sestava: 90 % 0,1 % TFA (100 mL TFA v 1000 mL ultra čisti dest. H₂O) in 10 % acetonitrila. Ko smo dosegli ustrezeno ločbo analitov in IS, smo poskušali skrajšati čas analize s spremembo pretoka. Večji kot je bil pretok, krajiši je bil čas analize, hkrati pa ni bistveno vplival na samo ločbo analitov in IS. Tako smo se odločili, da bomo uporabili pretok 1,5 mL/min. Če bi se odločili za višje pretoke, bi tvegali poškodbe kolone, zaradi delovanja

višji tlakov na samo kolono. Kot optimalno temperaturo kolone smo izbrali 25 °C. Čas celotne analize je znašal 15 min.

Na težavo smo naleteli pri ločbi meta in para-hipurne kisline. Zaradi izredno podobnih retencijskih časov obeh izomernih oblik ksilena nismo uspeli doseči popolne ločbe. Po injiciranju posameznega standarda smo ugotovili, da se para oblika hipurne kisline eluira pred meta-metil hipurno kislino (slika 7). Po pregledu literature ugotovimo, da je določenim študijam, ki so izvedle določitev metabolitov ksilena z enako metodo uspela popolna ločba vseh metil hipurnih kislin (43, 44). Predvidevamo, da bi z uporabo druge, ustreznejše kolone (če bi jo imeli na razpolago poleg Eclipse plus C18, 5µm, 150×4,6 mm in Phenomenex Kinetex C18, 2,6µm, 100×4,6 mm) in s spremembami optimizacije obstoječe metode (spremembo mobilne faze, itd.) uspeli popolnoma ločiti meta- in para-metil hipurno kislino med seboj.

Metodo smo validirali po smernicah FDA. Validacija metode je trajala deset dni.

Metoda se je izkazala za linearno v območju 6,0-100 µg/mL za vse standarde. Determinacijski koeficient (r^2) je za vse standarde enak ali večji od 0,999.

Razvita metoda HPLC pokriva območje mejnih vrednosti koncentracij metil hipurnih kislin, ki znaša 2000 mg/L (40).

Točnost metode smo preverjali pri devetih različnih koncentracijah (100, 50, 20, 10, 5, 2, 0,5, 0,2, 0,05 µg/mL). Po določilih FDA smernic, ki narekujejo, da mora povprečna vrednost odstopati manj kot 15 % od dejanske vrednosti oz. manj kot 20 % pri meji kvantifikacije, točnost ustreza za vse tri standarde, do vključno koncentracije 6 µg/mL. Rezultati v tabeli XVIII in XIX, ki so odebavljeni, odstopajo od priporočil FDA smernic. Vzrok za netočnost je lahko v stopnji ekstrakcije vzorca, kar lahko povzroči lažno povišanje rezultata.

Ponovljivost metode je ustrezala zahtevam za ponovljivost po FDA smernicah za vse tri standarde (N-(o-toluidil) glicin, N-(m-toluidil) glicin, N-(p-toluidil) glicin). Te določajo, da koeficient variacije ne sme biti večji od 15 %, pri meji kvantifikacije pa ne večji od 20 % (36). Vrednosti koeficientov variance (CV) ne odstopajo pri nobenem od standardov in pri nobeni od koncentracij (300 in 100 µg/mL).

Meja kvantifikacije za orto-metil hipurno kislino znaša $6,9 \mu\text{g/mL}$, za meta-, para-metil hipurno kislino pa $6,0 \mu\text{g/mL}$. Določili smo tudi mejo detekcije za posamezni standard. Meja detekcije za orto-metil hipurno kislino znaša $2,1 \mu\text{g/mL}$, za meta-, para-metil hipurno kislino pa $1,8 \mu\text{g/mL}$.

Šibkost metode je njena selektivnost, saj nam ni popolnoma uspelo ločiti vrhov meta- in para-metil hipurne kisline. Brez interferenc smo detektirali samo orto-metil hipurno kislino. Za interpretacijo rezultatov analize smo se odločili, da bomo komentirali koncentraciji meta- in para-metil hipurne kisline skupaj, saj ne moremo zagotovo trditi, kateremu izomeru ksilena določena koncentracija pripada (5).

Z metodo smo uspeli detektirati tudi hipurno kislino, ki pa smo jo v analitiki zaradi najverjetnejše pojavnosti le te tudi v kontrolnih vzorcih, opustili. Prisotnost hipurne kisline ni specifična samo za preiskovance, ki so izpostavljeni ksilenom, temveč jo lahko nevede, vsakodnevno preko zaužite hrane in v obliki metabolitov konservansov vnašamo v telo. Nekatera hrana kot so npr. brusnice, ki vsebujejo hipurno kislino, delujejo kot naravni antibiotik z uspešnim zaviranjem rasti bakterij *E.Coli*. Lahko pa so prisotni tudi metaboliti ostalih vnešenih snovi.

Eden od razlogov, zakaj nismo komentirali rezultatov koncentracij hipurne kisline, je tudi ta, da pri preiskovancih, ki so izpostavljeni ksilenom ne moremo zagotovo trditi, da pri posamezniku pri retencijskem času 4,936 kromatografski vrh pripada izključno hipurni kislini. Razlog za dvom je uporaba regeneriranega ksilena, ki so ga preiskovanci tudi uporabljali pri svojem delu. Za regeneracijo se izvede t.i. A-test za regeneriran ksilenski plinsko kromatografsko analizo. Ugotovljeno je bilo, da oba vzorca (tako regenerat kot standard) vsebujeta ksilenski plin v vseh treh njegovih izomerih, nekaj odstotkov etil benzena, ter sled toluena. To bi lahko ugotovili s primerjavo z ustreznim standardom, še bolje pa bi bilo, če bi uporabili GC-MS ali LC/MS analizno metodo, s katero bi identificirali posamezno strukturo analitov v vzorcu.

Robustnost metode smo preiskušali s spremembami temperature, pretoka in tlaka. Izkazalo se je, da je metoda dovolj robustna za spremembe. Trdimo lahko, da je kromatografski del analizne metode bolj robusten od priprave vzorcev. Kritični koraki analizne metode izvirajo iz priprave vzorcev. Le z zagotovitvijo konstantnih pogojev ekstrakcije dobimo zanesljive rezultate.

Metodo smo aplicirali na realne vzorce urina preiskovancev in na kontrolne vzorce prostovoljcev. Zaradi upoštevanja številnih dejavnikov (bolezni, menstrualnih ciklov, dopustov..) smo odvzem pri preiskovancih izvedli v dveh časovnih obdobjih (27.6.-8.7. in 8.8.-12.8.2011). V analizo je bilo vključenih šest preiskovancev iz histološkega (5 žensk in 1 moški), dva iz citološkega laboratorija (2 ženski) in sedem kontrolnih vzorcev. Vzorci urina preiskovancev so bili zbrani po zaključenem delavniku in shranjeni do analize na -70 °C. Kontrolni vzorci so bili zbrani naključno tekom dneva in do analize shranjeni na -70 °C (3, 5).

Najprej smo analizirali kontrolne vzorce. Dobljeni rezultati so prikazovali številne metabolite v urinu. Na težavo smo naleteli, saj se nam je tako pri kontrolnih vzorcih, kot kasneje tudi pri preiskovancih pojavljala signal pri približno identičnemu retencijskemu času 4,9. Retencijski časi so podobni kot pri testiranju standarda hipurne kisline, ki znaša 4,936. Tako predvidevamo, da imamo v kontrolnih vzorcih prisotno hipurno kislino in sicer pri kontrolnem vzorcu 1: 512,7 µg/mL, kontrolnem vzorcu 2: 213,8 µg/mL, kontrolnem vzorcu 3: 243,8 µg/mL, kontrolnem vzorcu 4: 77,8 µg/mL, kontrolnem vzorcu 5: 304,9 µg/mL, kontrolnem vzorcu 6: 398,3 µg/mL in kontrolnem vzorcu 7: 35,3 µg/mL. Zaradi morebitne pojavnosti hipurne kisline pri kontrolnih vzorcih nismo računali koncentracij hipurne kisline pri preiskovancih, saj ne moremo zagotovo trditi, da podobni retencijski časi ustrezajo hipurni kislini. Hipurna kislina ni specifični metabolit izpostavljenosti ksilenom. Da bi zagotovo vedeli ali je prisotna hipurna kislina, bi morali izbrati drugo analitično metodo (GC/MS, LC/MS) ali pa na obstoječo metodo HPLC testirati in določiti vsebnost etil benzena v mešanih ksilenih. Hipurna kislina je namreč glavni metabolit etil benzena in toluena.

Glede na pojavnost preostalih metabolitov v kontrolnih vzorcih in njihovih retencijskih časih lahko izključimo prisotnost metil hipurnih kislin.

Sledila je analiza preiskovanih vzorcev. Preiskovani vzorci od št.1-6 pripadajo preiskovancem v histološkem laboratoriju, vzorca št. 7 in 8 pa preiskovancema v citološkem laboratoriju. Preiskovance smo po časovnem obdobju spremljali na njihovih deloviščih in dnevnih nalogah znotraj laboratorija (narezovalnica, priprava aparatur za citološko in histološko barvanje, itd.).

Pri vseh analiziranih preiskovancih smo detektirali in s tem dokazali prisotnost metabolitov ksilena. Opazimo razlike v koncentracijah posamezne metil hipurne kisline. Koncentracija orto-metil hipurne kisline je znatno nižja kot koncentracija meta- in para-metil hipurne kisline. To je lahko posledica rokovanja preiskovancev z mešanimi ksileni (Mixed xylene,

SIGMA), pri katerih je meta izomer zastopan v kar 75-85 %. Meta- in para- izomera se po oksidaciji konjugirata z glicinom in se kot topna metabolita izločata v urin v obliki meta- in para-metil hipurne kisline (38).

Rezultati analize prikazujejo, da so koncentracije metabolitov ksilena občutno višje pri preiskovancih v histološkem, kot v citološkem laboratoriju ne glede na obdobje odvzema. Ne glede na koncentracijo je že sama prisotnost metabolitov ksilena patološka in predstavlja negativne posledice za posameznika in njegovo zdravje. Dovoljena meja izpostavitve ksilenom v 8 urnem delovniku znaša 221 mg/m^3 ali 50 ppm, pri čemer skupna mejna vrednost koncentracij orto-, meta- in para-metil hipurne kisline v urinu ne sme presegati 2000 mg/L (25, 28, 40). Skupne mejne vrednosti metil hipurnih kislin pri posameznemu preiskovancu so v območju dovoljene vrednosti.

V obdobju od 27.6.-8.7. v pojavnosti višjih koncentracij izstopata vzorca št. 1 in 4. Vzorca št. 5 in 6, ki sta bila odvzeta v drugem časovnem obdobju (8.8.-12.8.) imata znatno nižjo koncentracijo metabolitov ksilena napram preiskovanim vzorcem iz istega laboratorija odvzetih v prvem časovnem obdobju. Če ju primerjamo z vzorcema št. 7 in 8, ki pripadata preiskovancema v citološkem laboratoriju, so koncentracije vzorca št. 5 in 6 višje.

Razlike v koncentracijah so morebiti posledica razporeda delavnika znotraj laboratorija (izpostavljenost v kratkem času višjim koncentracijam ksilena zaradi priprave barvil, kislin, amoniaka, filtriranja večjih količin ksilena, priprave topil za barvanje..), izsesavanaja hlapov, prezračevanja (kar ugotavljamo, da je izredno pomanjkljivo in neustrezno), temperature prostora, ki se giblje nad 22°C , največje razlike pa obstajajo v naravi posameznika, v smislu individualnega metabolizma in aktivnosti encimov P450, ki sodelujejo pri pretvorbi ksilena v njegove metabolite.

6. SKLEPI

1. Razvili in validirali smo HPLC metodo, ki je preprosta, občutljiva in specifična avtomatizirana analitska metoda za direktno določanje orto-, meta-, para-metil hipurnih kislin v urinu in s tem lahko ovrednotimo izpostavljenost preiskovancev ksilenov.
2. Identificirana hipurna kislina ni specifična le za preiskovano skupino ($n=8$), ki je izpostavljena ksilenom vsakodnevno, temveč se pojavlja tudi v kontrolni skupini ($n=7$). Sklepamo, da je njena prisotnost lahko posledica konzervansov v hrani, v manjši meri je lahko posledica nezavedne izpostavljenosti ksilenom.
3. V preiskovani skupini smo dokazali prisotnost koncentracij metil hipurnih kislin v urinu, ki pa je višja od tistih ugotovljenih v kontrolni skupini, a še vedno v dovoljenih mejah.
4. Zaradi narave dela v histološkem in citološkem laboratoriju in vsakodnevne izpostavljenosti ksilenom sklepamo, da je nujno potrebno pri posamezniku pred prvim nastopom na delovno mesto izvesti ustrezni zdravstveni pregled. Le ta bi moral podrobno proučiti funkcijo in integriteto centralnega živčnega sistema, ledvic, jeter in krvi. Potrebna bi bila dodatna pozornost pri že obstoječih boleznih, ki bi se lahko poslabšale zaradi izpostavljenosti zaposlenega ksilenom, ter stanj, kjer bi prišlo do poslabšanja stanja zaposlenega že pri zakonsko dovoljenih koncentracijah ksilena na delavnem mestu.
5. Redno bi bilo potrebno spremeljanje zdravstvenega stanja zaposlenih v histološkem in citološkem laboratoriju v obliki periodičnih zdravstvenih pregledov, ki jih določa zakon o varstvu pri delu. Trenutno stanje zaposlenega pri pregledu je potrebno primerjati s stanjem pred nastopom na delovno mesto ali pa napram primerne kontrolne populacije (redno izvajati biološki monitoring izpostavljenosti).

7. LITERATURA

1. Lunder M, Žiberna L. Toksikokinetika in toksikodinamika zastrupitev z organskimi topili. Med.razgl. 2009; 48: 115-27.
2. www.wikipedia.org (23.9.11)
3. U.S. Department of health and human services. Toxicological profile of xylene. Avgust 2007, str: 13-268. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles> (25.9.11)
4. U.S. Environmental Protection Agency. Locating and estimating air emissions from sources of xylene. Marec 1994; str.: 1-196. <http://www.epa.gov> (25.9.11)
5. Hippuric and Methyl hippuric acids in urine. NOISH Manual of Analytical Methods, Fourth Edition. March 15th 2003; 3: 1-5. <http://www.cdc.gov/niosh> (5.10.11)
6. www.sbioinformatics.com. Physical and chemical properties of xylene (23.9.11)
7. Aspey S.M., Pereira L., Milton D. Determination of Occupational Exposure to Aromatic Solvents Through Metabolite Monitoring Using Isocratic HPLC. Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK. 2008. <http://www.polygen.com> (26.9.11)
8. Gargas ML, Burgess RJ, Voisard DE, et al. Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. Toxicol Appl Pharmacol 1989; 98: 87-99.
9. Lam CW, Galen TJ, Boyd JF, et al. Mechanism of transport and distribution of organic solvents in blood. Toxicol Appl Pharmacol 1990; 104: 117-29.
10. Omiecinski CJ, Remmel RP, Hosagrahara VP. Concise review of cytochrome P450s and their roles in toxicology. Toxicol Sci 1999; 48: 151-56.
11. Porubsky PR, Battaile KP, Scott E. Human Cytochrome P450 E21 Structures with Fatty Acid Analogs Reveal a Previously Unobserved Binding Mode. The Journal of biological chemistry. 16.july 2010; 285: 22282-90.
12. Raucl JL, Lasker JM, Kraner JC, et al. Induction of cytochrome P450E1 in the obese overfed rat. Mol Pharmacol 1991; 39: 275-80.
13. Yang CS., Brady JF, Hong JJ. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. The FASEB Journal. January 1992; 6: 737-44.
14. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Edwards JW et al. Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-and p-xylene. JPET. January 1996; 276: 101-08.
15. Nakajima T. Cytochrome P450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. J Occup Health 1997; 39: 83-91.

16. Blanchard KT, Moriss JB. Effects of m-xylene on rat nasal cytochrome P450 mixed function oxidase activity. *Toxicol Lett* 1994; 70: 253-59.
17. Liira J, Riihimaki V, Engström K et al. Coexposure of man to m-xylene and methyl ethyl ketone: Kinetics and metabolism. *Scand J Work Environ Health* 1988; 14: 322-27.
18. Liira J, Elovaara E, Raunio H et al. Metabolic interaction and disposition of methylethyketone and m-xylene in rats at single and repeated inhalation exposures. *Xenobiotica* 1991; 21: 53-64.
19. Backes WL, Sequeira DJ, Cawley GF, et al. Relationship between hydrocarbon structure and induction of P450: Effects on protein levels and enzyme activities. *Xenobiotica* 1993; 23 (12): 1353-66.
20. Wronska-Nofer T, Rosin J, Bartoz G. Interaction of ethanol and xylene in their effects on erythrocytes and other hematological parameters in the rat. *J Appl Toxicol* 1991; 11: 289-92.
21. Tardif R, Sato A, Lapare S, Brodeur J. Ethanol induced modification of m-xylene toxicokinetics in humans. *Occupational and Environmental Medicine* 1994; 51: 187-91.
22. Freundt KJ, Romer KG, Federsel RJ. Decrease of inhaled toluene, ethyl benzene, m-xylene, or mesitylene in rat blood after combined exposure to ethyl acetate. *Bull Environ Contam* 1989; 42: 495-98.
23. Medinsky MA, Schlosser PM, Bond JA. Critical issues in benzene toxicity and metabolism: the effect of interactions with other organic chemicals on risk assessment. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 9: 119-24.
24. Varnostni list (v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta in Zakonom št. 67/2010 Zbirke zakonov): Ksilen. Zadnja revizija 27.12.2010.
25. Varnostni list SIKA(v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 (REACH), Priloga II-Slovenija: Ksilen. <http://svn.sika.com> (4.10.11)
26. http://www.drmed.org/strok/nujna_stanja.(4.10.11)
27. Reese E, Kimbrough RD. Acute Toxicity of Gasoline and Some Additives. *Environmental Health Perspectives Supplements* 1993; 101 (Suppl.6): 115-31.
28. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Projekt:Ksileni> (4.10.11)
29. Varnostni list MITOL : Mitosol S 50. Datum zadnje revidirane izdaje 1.6.2008; str.: 1-5. <http://www.mitol.si> (7.10.11)
30. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (7.10.11)
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12823/> (7.10.11)

32. Mohorčič K, Mramor A, Veber M. Seminarska naloga pri predmetu Biomedicinska analitika: HPLC, primer uporabe. Ljubljana, 18. december 2009.
33. Forgács E, Cserháti T: Chromatograpgy/Principles, Elsevier Science Ltd, Budimpešta, 2003: 1259-67.
34. Moreno-Arribas MV, Polo MC: Chromatography/High-preformance Liquid Chromatography, Elsevier Science Ltd, Madrid, 2003: 1274-80.
35. L. Huber: Validation of HPLC Methods, LabCompliance 2001.
36. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001.
37. Marchese S, Curini R, Gentili D, Rocca LM: Simultaneous determination of the urinary metabolites of benzene, toluene, xylene and styrene using high-performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time of flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2004; 18 (3): 265-72.
38. Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y: Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene. Brit. J.industr. Med., 1969; 26: 330-34.
39. Kozlowska K, Polkowska Ź, Przyjazny A, Namiesnik J: Analytical Procedures Used in Examining Human Urine Samples. Polish Journal of Environmental Studies 2003; 12 (5): 503-21.
40. Kramer A, Linnert M Jr., Wrbitzky R, Angerer J: Occupational chronic exposure to organic solvents XVII. Ambient and biological monitoring of workwrs exposed to xylenes. Int Arch Occup Environ Health 1999; 72 (1): 52-5.
41. Koželj M, Lah A, Stopar P. Seminarska naloga pri predmetu Biomedicinska analitika: Uporaba tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo v farmakokinetičnih in kliničnih laboratorijih. Ljubljana, 2009.
42. <http://www.freerdrinkingwater.com/water-contamination/xylene> (23.3.12)
43. Tradif R., Brodeur J: Simultaneus High-Preformance Liquid Chromatographic Analysis of Hippuric Acis and ortho-, meta-, and para-Methyl hippuric Acids in Urine. J Anal Toxicol Nov.-Dec. 1989; 13 (6): 313-6.
44. Poggi G., Giusiani M., Palagi U., Paggiaro P.L: High-Preformance Liquid Chromatography for Quantitative Determination of the Urinary Metabolites of Toluene, Xylene and Styrene. Int Arch Occup Environ Health 1982; 50 (1): 25-31.

8. PRILOGE

V priloženih tabelah so prikazani podatki o prisotnosti posameznih metabolitov, njihovi odzivi in izračunane koncentracije pri preiskovancih in kontrolnih vzorcih.

Tabela 1: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 1 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
1	5176,9	2,55	133,33	25,2	0,01	0,79	5292,9	2,60	152,3	153,1	27.6. A
1	4525,8	2,40	125,82	27,9	0,01	0,95	4840,3	2,57	150,3	151,3	27.6. B
1	5300,2	2,43	127,43	29,9	0,01	0,88	5599,4	2,57	150,4	151,3	27.6. C
1	1295,8	0,64	33,38	29,2	0,02	1,44	6999,5	5,40	315,9	317,3	29.6. A
1	1313,2	0,66	34,43	24,6	0,02	1,19	7000,6	5,33	311,8	312,9	29.6. B
1	1253,8	0,64	33,68	23,9	0,02	1,21	6713,7	5,35	313,1	314,3	29.6. C
1	3500,7	1,77	92,70	58,6	0,03	1,89	4218,2	2,13	124,8	126,7	1.7. A
1	4286,9	2,12	110,98	56,2	0,03	1,77	5427,6	2,68	156,9	158,7	1.7. B
1	3641,4	1,73	90,38	51,4	0,02	1,55	4555,0	2,16	126,3	127,9	1.7. C
1	5680,3	3,13	163,63	35,6	0,01	0,40	917,3	0,16	9,44	9,8	4.7. A
1	4915,3	3,00	157,26	31,0	0,01	0,40	802,5	0,16	9,54	9,9	4.7. B
1	5722,6	3,07	160,54	33,8	0,01	0,38	919,2	0,16	9,39	9,8	4.7. C
1	3784,1	1,84	96,34	36,2	0,02	1,12	7461,3	3,63	212,2	213,3	6.7. A
1	3688,0	1,74	91,31	35,3	0,02	1,06	7334,0	3,47	202,8	203,9	6.7. B
1	3718,2	1,76	92,25	33,7	0,02	1,02	7508,5	3,56	208,1	209,1	6.7. C
1	8291,5	4,04	211,37	104,4	0,05	3,24	19804,5	9,64	563,9	567,2	8.7. A
1	7815,1	4,20	219,65	84,1	0,05	2,88	19202,5	10,31	602,8	605,7	8.7. B
1	7633,4	3,98	208,62	82,7	0,04	2,75	19212,5	10,03	586,5	589,3	8.7. C

Legenda: koncentracije so v µg/mL. A,B, C pomeni število ponovitev

Tabela 2: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 2 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
2	1160,2	0,52	27,05	18,59	0,01	0,53	3256,6	1,45	84,8	85,3	27.6. A
2	1229,2	0,54	28,49	16,82	0,01	0,47	3493,3	1,55	90,4	90,9	27.6. B
2	1249,2	0,56	29,08	16,22	0,01	0,46	3572,4	1,59	92,9	93,4	27.6. C
2	251,0	0,55	28,93				695,9	2,77	162,1	162,1	29.6. A
2	277,6	0,56	29,26				750,5	2,70	158,1	158,1	29.6. B
2	262,6	0,57	29,93				715,2	2,72	159,3	159,3	29.6. C
2	257,1	0,46	24,33	37,86	0,02	1,02	1074,5	4,18	244,4	245,4	1.7. A
2	266,6	0,51	26,91	39,65	0,02	1,17	1101,3	4,13	241,6	242,8	1.7. B
2	249,7	0,54	28,36	29,38	0,02	1,04	1035,8	4,15	242,6	243,6	1.7. C
2	2318,4	1,42	74,29	25,6	0,01	0,70	489,6	0,21	12,4	13,1	4.7. A
2	2873,9	1,40	73,20	28,3	0,01	0,63	602,8	0,21	12,3	12,9	4.7. B
2	2683,7	1,34	69,93	29,9	0,01	0,71	566,1	0,21	12,3	13,0	4.7. C
2	1414,8	0,52	27,26	31,30	0,01	0,73	4053,9	1,49	87,2	87,9	6.7. A
2	1298,2	0,61	31,76	32,3	0,02	0,96	3693,8	1,73	100,9	101,9	6.7. B
2	1356,2	0,60	31,45	35	0,02	0,99	3922,9	1,74	101,6	102,6	6.7. C
2	444,6	0,89	46,35	12,9	0,02	1,85	1353,9	3,05	178,1	179,9	8.7. A

2	441,9	0,89	46,60	15,3	0,03	2,21	1365,6	3,09	180,7	182,9	8.7. B
2	468,7	0,91	47,63	14,3	0,03	1,94	1420,6	3,03	177,2	179,1	8.7. C

Legenda: koncentracije so v $\mu\text{g}/\text{mL}$. A,B, C pomeni število ponovitev

Opomba: Odzivi koncentracij orto-HK kisline so bili prenizki, zato ni oddanih meritev (izvajali smo ročno integracijo kromatograma).

Tabela 3: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 3 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
3	2026,2	4,74	248,2	12,9	0,01	0,41	3926,0	1,94	113,3	113,7	27.6. A
3	1083,1	3,75	196,6	17,4	0,02	1,02	2069,7	1,91	111,7	112,7	27.6. B
3	2134,1	4,58	239,6	18,3	0,01	0,55	4182,6	1,96	114,6	115,2	27.6. C
3	862,1	1,93	100,9	21,8	0,03	1,61	2008,9	2,33	136,3	137,9	29.6. A
3	854,9	1,84	96,4	21,1	0,02	1,57	1993,9	2,33	136,4	137,9	29.6. B
3	921,9	1,94	101,6	21,2	0,02	1,46	2175,9	2,36	138,0	139,5	29.6. C
3	5494,8	13,5	704,1	19,2	0,003	0,22	4729,9	0,86	50,3	50,5	1.7. A
3	5864,8	14,9	781,1	19,5	0,003	0,21	5018,2	0,86	50,0	50,2	1.7. B
3	5316,4	11,9	622,6	18,5	0,003	0,22	4576,9	0,86	50,3	50,5	1.7. C
3	8292,5	4,25	222,5	66,9	0,01	0,51	782,5	0,09	5,52	6,0	4.7. A
3	8393,9	4,39	229,7	66,3	0,01	0,50	785,6	0,09	5,47	5,90	4.7. B
3	8343,6	4,17	218,3	65,7	0,01	0,50	786,9	0,09	5,52	6,0	4.7. C
3	1350,9	2,64	138,2	19,8	0,01	0,93	2290,5	1,69	99,2	100,1	6.7. A
3	1358,6	2,64	138,5	20,2	0,01	0,95	2290,7	1,69	98,6	99,6	6.7. B
3	1224,2	2,85	149,3	18	0,01	0,94	1994,4	1,63	95,3	96,2	6.7. C
3	1648,1	3,91	204,7	11,4	0,01	0,44	2297,9	1,39	81,5	81,9	8.7. A
3	1600,6	3,88	203,1	10,2	0,01	0,41	2247,2	1,40	82,1	82,5	8.7. B
3	1536,8	4,06	212,6	10,8	0,01	0,45	2173,8	1,41	82,7	83,2	8.7. C

Legenda: koncentracije so v $\mu\text{g}/\text{mL}$. A,B, C pomeni število ponovitev

Tabela 4: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 1 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
4	1699,4	3,52	184,1	23,5	0,01	0,88	5521,9	3,25	190,0	190,9	27.6. A
4	1614,3	3,57	187,1	23,3	0,01	0,92	5218,3	3,23	189,0	189,9	27.6. B
4	1873,8	3,78	198,1	24,5	0,01	0,83	5928,2	3,16	185,0	185,8	27.6. C
4	1310,7	2,61	136,5	41,1	0,03	1,99	4377,1	3,34	195,3	197,3	29.6. A
4	1366,2	2,66	139,1	40,0	0,03	1,86	4545,9	3,33	194,6	196,5	29.6. B
4	1222,6	2,68	140,1	39,1	0,03	2,04	4039,6	3,30	193,2	195,2	29.6. C
4	305,7	0,64	33,3	15,1	0,05	3,15	1599,9	5,23	306,1	309,3	1.7. A
4	256,4	0,50	26,4				1447,4	5,65	330,1	330,1	1.7. B
4	311,7	0,69	36,1	16,6	0,05	3,39	1841,4	5,91	345,5	348,9	1.7. C

Legenda: koncentracije so v $\mu\text{g}/\text{mL}$. A,B, C pomeni število ponovitev

Opomba: Odzivi koncentracij orto-HK kisline so bili prenizki, zato ni oddanih meritev (izvajali smo ročno integracijo kromatograma).

Tabela 5: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 5 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
5	11175,0	7,07	369,9	82,2	0,01	0,47	8536,0	0,76	44,7	45,2	8.8. A
5	11066,0	6,96	364,6	81,7	0,01	0,47	8518,2	0,77	45,0	45,5	8.8. B
5	11199,7	7,27	380,5				8455,6	0,75	44,2	44,2	8.8. C
5	18443,0	12,5	652,0	134,2	0,01	0,46	8296,5	0,45	26,3	26,8	10.8. A
5	18368,0	12,7	666,2	145,4	0,01	0,50	8251,6	0,45	26,3	26,8	10.8. B
5	19470,0	11,6	606,1	139,8	0,01	0,46	9334,8	0,48	28,0	28,5	10.8. C
5	9888,3	4,92	257,4	40,67	0,02	1,29	2635,3	1,31	76,6	77,9	12.8. A
5	9845,9	4,80	251,1	39,39	0,02	1,22	2568,5	1,25	73,2	74,4	12.8. B
5	10243,8	4,66	244,0	40,8	0,02	1,18	2708,8	1,23	72,1	73,3	12.8. C

Legenda: koncentracije so v µg/mL. A,B, C pomeni število ponovitev

Opomba: Odzivi koncentracij orto-HK kisline so bili prenizki, zato ni oddanih meritev (izvajali smo ročno integracijo kromatograma).

Tabela 6: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 6 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
6	4943,5	2,91	152,4	47,9	0,03	1,79	1422,9	0,84	48,9	50,7	8.8. A
6	5464,5	2,75	144,2	58,7	0,03	1,89	1639,4	0,83	48,3	50,2	8.8. B
6	5121,3	2,77	145,2	60,6	0,03	2,01	1514,3	0,82	47,9	49,9	8.8. C
6	1901,0	0,97	51,0	49,9	0,03	1,63	1512,8	0,78	45,3	46,9	10.8. A
6	2265,5	1,06	55,4	53,1	0,02	1,58	1590,5	0,74	43,4	44,9	10.8. B
6	2178,0	1,10	57,7	47,6	0,02	1,54	1555,9	0,79	46,0	47,5	10.8. C
6	2996,2	6,93	362,6	18,7	0,01	0,39	808,4	0,27	15,8	16,2	12.8. A
6	2925,1	6,64	347,8	15,5	0,01	0,34	786,1	0,28	15,7	16,0	12.8. B
6	3495,8	7,10	371,9	17,3	0,004	0,32	954,3	0,27	15,9	16,2	12.8. C

Legenda: koncentracije so v µg/mL. A,B, C pomeni število ponovitev.

Tabela 7: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 7 v različnih časovnih obdobjih

Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
7	5350,3	2,88	150,9	36,4	0,01	0,43	1253,4	0,23	13,7	14,1	8.8. A
7	5575,5	2,98	155,9	42,4	0,01	0,48	1307,3	0,23	13,7	14,2	8.8. B
7	5974,5	2,94	153,8	45,4	0,01	0,48	1369,8	0,23	13,4	13,9	8.8. C
7	6356,9	3,08	161,1	28,5	0,01	0,88	532,9	0,26	15,1	15,9	10.8. A
7	5118,1	2,84	148,9	21,9	0,01	0,77	449,6	0,25	14,6	15,4	10.8. B
7	5772,0	2,90	151,7	27,9	0,01	0,89	495,1	0,25	14,5	15,4	10.8. C
7	3554,2	7,43	388,9	24,1	0,01	0,43	1159,2	0,33	19,1	19,5	12.8. A
7	3150,1	7,28	380,9	22,4	0,01	0,45	1008,3	0,32	18,7	19,2	12.8. B
7	3718,9	6,73	352,3	24,4	0,01	0,42	1203,1	0,32	18,9	19,3	12.8. C

Legenda: koncentracije so v µg/mL. A,B, C pomeni število ponovitev.

Tabela 8: Prikaz koncentracij in odzivov preiskovanega vzorca 8 v različnih časovnih obdobjih

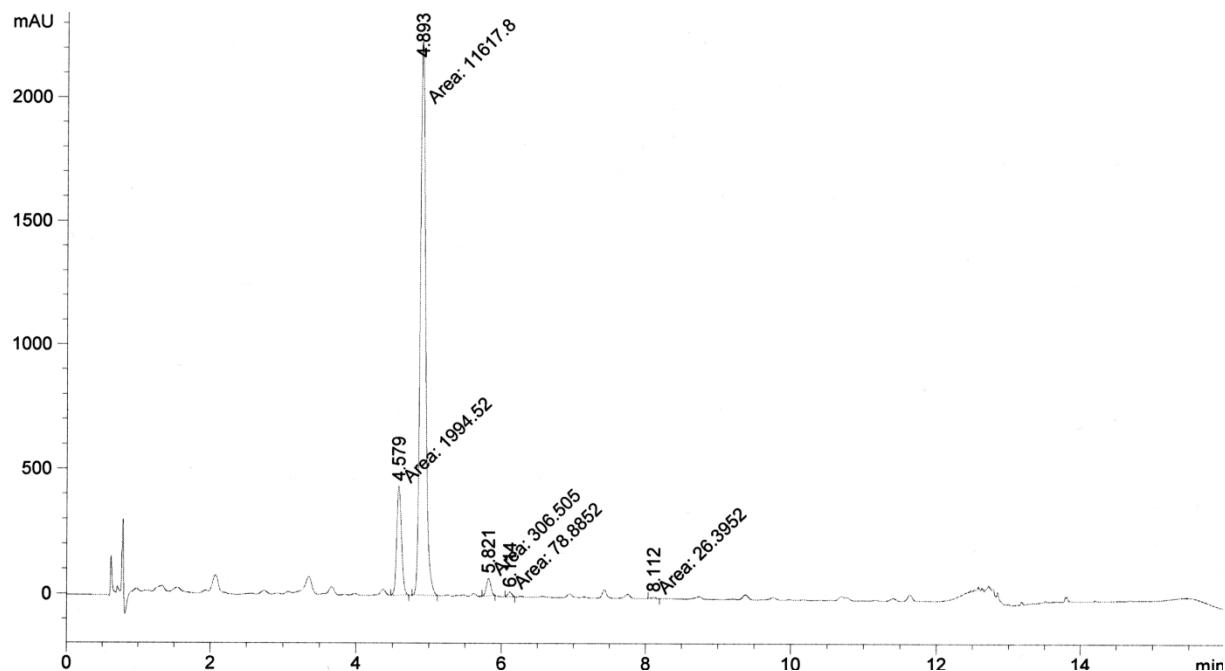
Vzorec	AUC (HK)	V/IS	Konc. (HK)	AUC (o-HK)	V/IS	Konc. (o-HK)	AUC (m,p-HK)	V/IS	Konc. (m,p-HK)	Vsota konc. o, m, p-HK izomer	Opombe (datumi odvzema)
8	1151,4	0,61	32,1	27,7	0,02	1,53	634,2	0,55	32,2	33,7	8.8. A
8	1034,2	0,60	31,5	26,2	0,03	1,61	570,5	0,55	32,3	33,9	8.8. B
8	1208,4	0,58	30,4	29,7	0,02	1,57	670,2	0,55	32,4	33,9	8.8. C
8	1248,7	0,54	28,5	18,4	0,01	0,94	839,2	0,67	39,3	40,2	10.8. A
8	1164,0	0,54	28,1	17,7	0,02	0,97	775,3	0,67	38,9	39,9	10.8. B
8	1053,8	0,59	30,7	17,1	0,02	1,03	690,7	0,66	38,3	39,3	10.8. C
8	9828,4	4,61	241,6	77,2	0,04	2,30	1697,1	0,80	46,6	48,9	12.8. A
8	10097,1	5,01	262,1	97,4	0,05	3,08	1675,3	0,83	48,6	51,7	12.8. B
8	10267,3	4,86	254,3	97,8	0,05	2,95	1708,0	0,81	47,3	50,3	12.8. C

Legenda: koncentracije so v µg/mL. A,B, C pomeni število ponovitev.

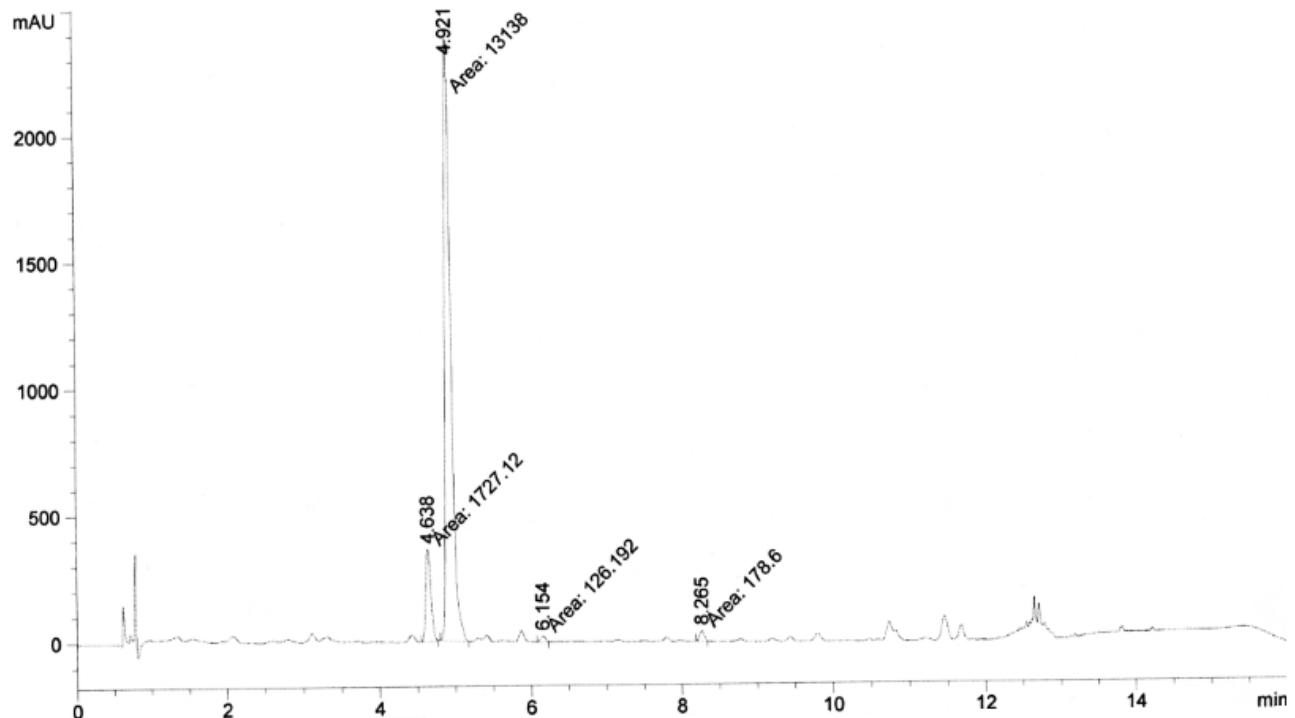
Tabela 9: Prikaz povprečja koncentracij in retencijskih časov metabolitov v kontrolnih vzorcih

Kontrolni vzorec	Konc. morebitne HK	Konc. neznanih spojin 1	Retencijski čas neznanih spojin 1	Konc. neznanih spojin 2	Retencijski čas neznanih spojin 2
1	512,7	5,47	6,19	2,69	8,78
2	213,8	1,87	6,21	1,07	8,76
3	243,8	2,57	6,19	1,96	8,68
4	77,8	0,44	6,10	2,44	8,71
5	304,9	0,43	6,11	0,13	8,11
6	398,3	0,61	6,15	0,79	8,26
7	35,3	2,54	6,09	4,12	8,69

Legenda: koncentracije so v µg/mL (podane kot povprečna meritev)



Slika 17: Prikaz retencijskih časov metabolitov pri kontrolnem vzorcu št. 5.



Slika 17: Prikaz retencijskih časov metabolitov pri kontrolnem vzorcu št. 6 (Opomba: Sklepamo, da najvišji vrh v kromatogramu pripada hipurni kislini).

Tabela 10: Prikaz spola in starosti preiskovancev

SPOL	STAROST
M	41
Ž	45
Ž	41
Ž	38
Ž	37
Ž	36
Ž	26
Ž	24

Tabela 11: Prikaz spola in starost kontrolne skupine

SPOL	STAROST
M	42
M	23
Ž	32
Ž	38
Ž	40
Ž	42
Ž	46