

Biologický expoziční test (BET) pro benzen: současné stanovení kyseliny *t,t*-mukonové a S-fenylmerkapturové v lidské moči



Iveta Hanzlíková, Jaroslav Mráz



Státní zdravotní ústav, Praha

Centrum hygieny práce a pracovního lékařství
Oddělení pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovištích

Benzen

bezbarvá kapalina, téměř nerozpustná ve vodě, bod varu 80 °C

Výskyt a využití

- složka ropy
- chemická surovina pro syntézu mnoha dalších sloučenin
- (nechtěná) složka palivového benzínu
- (nechtěná) složka průmyslových rozpouštědel

Zdravotní rizika:

- při vyšších expozicích: narkotický účinek, bolest hlavy, únava, dušnost, dráždění sliznic
- nejzávažnější účinek: prokázaný lidský karcinogen (poškození kostní dřeně → leukémie, rakovina plic)

Hodnocení expozice v pracovním prostředí:

- stanovení v pracovním ovzduší
- biologické monitorování (biologický expoziční test, BET)

Hodnocení expozice benzenu na pracovištích

Hygienické limity benzenu v pracovním ovzduší
(nařízení vlády č. 361/2007 Sb., příloha č. 2)

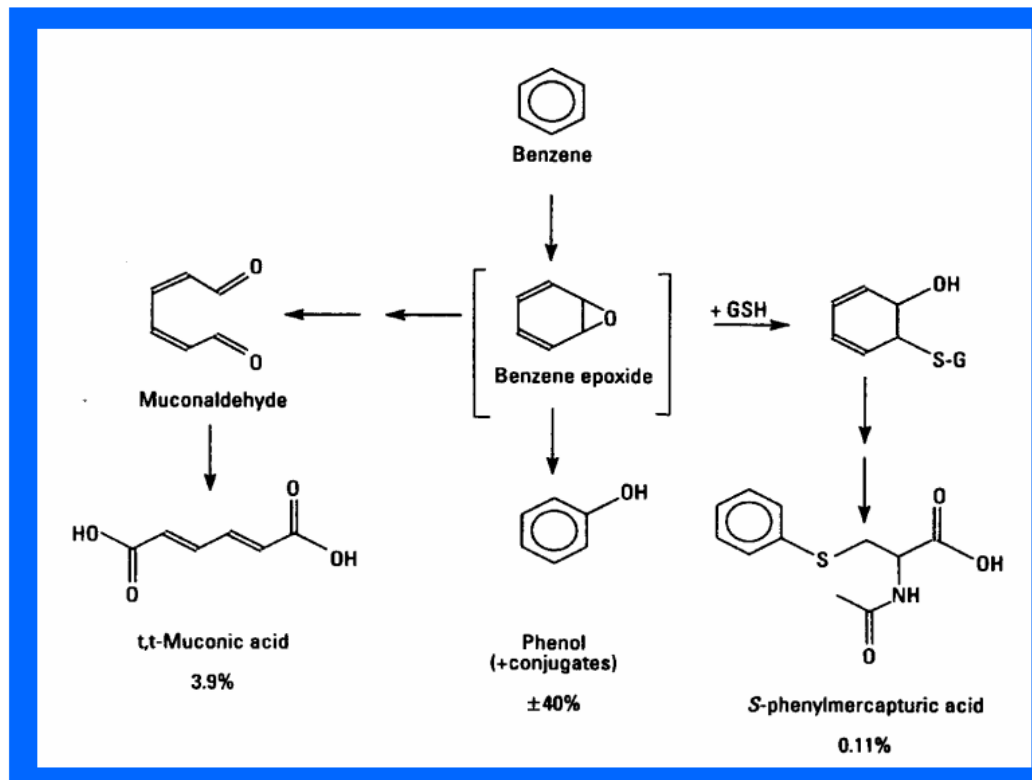
Období	PEL		NPK-P		Poznámky
	mg.m ⁻³	ppm	mg.m ⁻³	ppm	
1980	50		80		
do 5.4.2024	3,25	1	10	3,08	B, D, I, K, M, P
do 5.4.2026	1,65	0,5	-	-	B, D, I, K, M, P
od 5.4.2026	0,66	0,2	-	-	B, D, I, K, M, P

poznámka D: při expozici se významně uplatňuje pronikání faktoru kůží

Teisinger a kol., Expoziční testy v průmyslové toxikologii, Avicenum 1980:
„V posledních letech se zvláště často diskutuje výskyt leukémie u pracujících s benzenem a většinou se příčinná souvislost přiznává.“

Možnosti biologického monitorování benzenu

- benzen (moč)
- benzen (krev)
- **fenol** (moč)
- **kyselina *t,t*-mukonová** (moč)
- **kyselina S-fenylmerkapturová** (moč)



Ukazatele (biomarkery) expozice benzenu v moči

Fenol

- historicky první stanovovaný biomarker benzenu (fotometrie)
- metabolický výtěžek z benzenu ~ 40 %
- vylučován ve formě konjugátů (glukuronid, sulfát)
- poločas vylučování:
- vysoké hladiny i u osob neexponovaných benzenu (~5-10 mg/den)
- **nepoužitelný pro hodnocení nízkých expozic benzenu**

Kyselina *t,t*-mukonová (*t,t*-MA)

- metabolický výtěžek z benzenu ~ 4 %
- poločas vylučování: 5 h
- stanovení metodou HPLC-UV
- nízké hladiny u osob neexponovaných benzenu (nekuřák <0,1 mg/den)
- **vhodný pro hodnocení nižších expozic benzenu**

Kyselina S-fenylmerkapturová (SPMA)

- metabolický výtěžek z benzenu ~ 0,11 %
- poločas vylučování: 9-13 h
- stanovení metodami GC-MS, HPLC-MS, ELISA
- extrémně nízké hladiny u osob neexponovaných benzenu (< 0,002 mg/den)
- **vhodný pro hodnocení nejnižších expozic benzenu**

Hodnocení expozice benzenu na pracovištích

Limitní hodnoty ukazatelů BET (biologické limitní hodnoty)
(vyhláška č. 107/2013 Sb., příloha č. 2, tabulka č. 1)

Látka	Ukazatel	Limitní hodnoty		Doba odběru
Benzen	S-Fenylmerkapturová kyselina	0,05 mg/g kreatininu	0,024 μmol/mmol kreatininu	konec směny
	<i>t,t</i> -Mukonová kyselina	1,5 mg/g kreatininu	1,2 μmol/mmol kreatininu	konec směny

SZÚ, Národní referenční laboratoř (NRL) pro biologické monitorování expozice chemickým látkám v pracovním prostředí: zavedeny metody pro stanovení obou ukazatelů:

S-Fenylmerkapturová kyselina (SPMA)

extrakce na pevné fázi (SPE), stanovení HPLC/MS, neakreditováno, ověřeno mezinárodními porovnávacími zkouškami G-EQUAS

***t,t*-Mukonová kyselina (*t,t*-MA)**

extrakce kapalina-kapalina (LLE), stanovení HPLC/UV, akreditováno, ověřeno mezinárodními porovnávacími zkouškami G-EQUAS

Charakteristiky metod pro stanovení *t,t*-MA a SPMA v moči

Společné rysy obou metod:

- extrakce - izolace metabolitu z moči
- chromatografické stanovení

Specifické rysy každé metody:

t,t-MA

- extrakce kapalina-kapalina (LLE) – levná, velmi snadné provedení, spolehlivé výsledky, nižší účinnost čištění (jsou extrahovány všechny složky s obdobnými fyz.-chem. vlastnostmi)
- stanovení HPLC/UV – běžně dostupné vybavení, nižší citlivost, nižší selektivita

SPMA

- extrakce na pevné fázi (SPE) – nákladnější, pracnější, nutná optimalizace metody, vysoká účinnost čištění
- stanovení HPLC/MS – nákladné a málo dostupné vybavení, velmi vysoká citlivost, velmi vysoká selektivita

Trend v ochraně zdraví při expozicích benzenu na pracovištích:

snižování expozice → povinné snižování hygienických limitů PEL (2024, 2026) → očekávané snižování limitů BET → preference stanovení SPMA + nutnost posoudit vhodnost původní HPLC/UV metody pro stanovení *t,t*-MA

Plán NRL:

Vyvinout a akreditovat HPLC/MS metodu pro současné (vysoce citlivé a selektivní) stanovení SPMA a *t,t*-MA v moči.

Přínos:

- komplexnější informace o expozici benzenu využitím obou ukazatelů
- posouzení vhodnosti stávající HPLC/UV metody pro stanovení *t,t*-MA

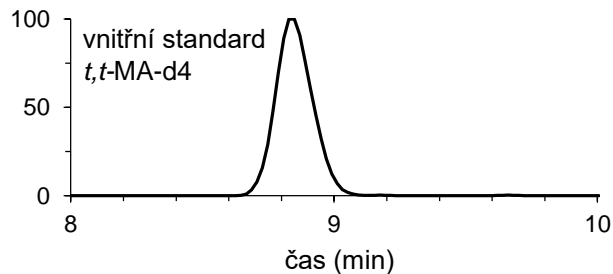
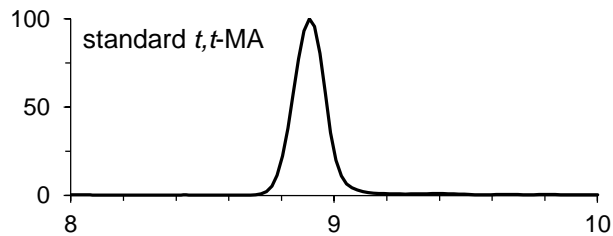
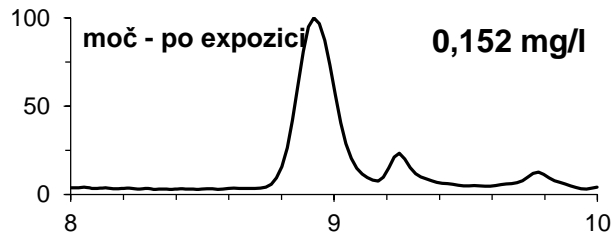
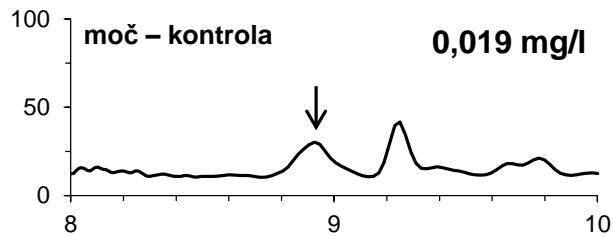
Nová HPLC/MS metoda pro současné stanovení SPMA a *t,t*-MA v moči

- současná izolace SPMA i *t,t*-MA z moči pomocí SPE neschůdná
- použita extrakce kapalina-kapalina (methyl-terc.butylether)
- HPLC podmínky: mírně upravena stávající metoda pro SPMA
- MS podmínky: stávající pro SPMA, nalezení a optimalizace podmínek pro *t,t*-MA
- kvantifikace: isotopicky značené standardy d_5 -SPMA a d_4 -*t,t*-MA

Vypracovaná metoda byla ověřena úspěšnou účastí v mezinárodních porovnávacích zkouškách G-EQUAS. V současné době je validována, poté bude předložena k akreditaci ČIA a zařazena do nabídky služeb NRL.

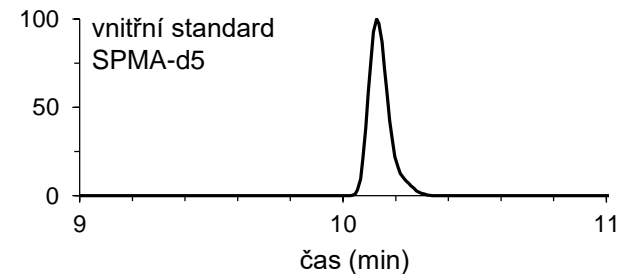
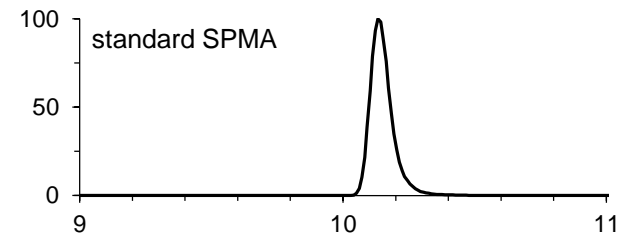
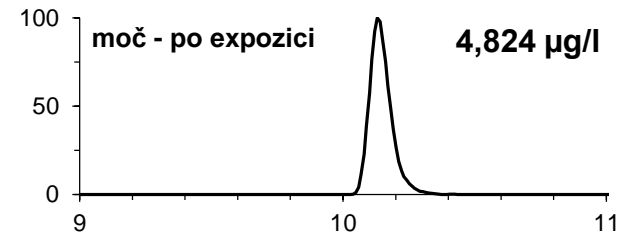
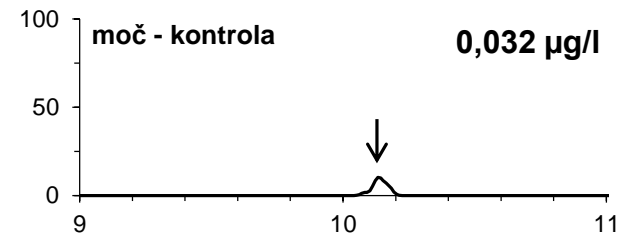
t,t-MA

HPLC/MS: [M-H]⁻ 141,0193 → 97,0295



SPMA

HPLC/MS: [M-H]⁻ 238,0543 → 109,0116



Poděkování

Ministerstvu zdravotnictví ČR:

**Projekt institucionální podpory RVO
(Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330)**