

PRAKTIČNA VRIJEDNOST  
SEMIKVANTITATIVNOG RAINSFORD-DAVIES  
TESTA ZA ODREĐIVANJE FENOLA U URINU  
KOD EKSPOZICIJE PARAMA BENZENA

L. ŠTILINOVIĆ, EDITA KERŠANČ, S. KRALJ I  
A. GLIHA

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb*

*(Primljeno 23. XI 1967)*

Ispitana je vrijednost semikvantitativnog fenol testa u odnosu na kvantitativne analize. Istraživanja su provedena na grupi od 50 radnika eksponiranih parama benzena jedne zagrebačke tvornice lijekova. Kontrolna grupa bilo je 20 radnika iste tvornice

Reakcija testa se temelji na stvaranju plave boje između prisutnog fenola i 2,6-diklorokinon-4-klorimida (Gibbsov reagens) u lužnatom mediju (pH 10,15). Intenzitet boje je linearno proporcionalan koncentraciji fenola u urinu, odnosno koncentraciji benzena u zraku. Rezultati su pokazali da semikvantitativno određivanje daje vrlo dobar uvid u grupnu i individualnu ekspoziciju parama benzena. Zbog jednostavnosti i brzine izvođenja, ta metoda ima praktičnu prednost pred drugima.

Benzen se vrlo mnogo upotrebljava u kemijskoj industriji kao polazna sirovina za razne sinteze. Kao otapalo također ima široku primjenu, ali zbog svoje toksičnosti često je zamijenjen s manje opasnim aromatskim i alifatskim derivatima. Međutim, benzen se vrlo često nalazi »maskiran« u drugim otapalima, naročito u svojim homolozima. Tako na primjer toluen, koji najčešće zamjenjuje benzen, može sadržavati i više od 11% benzena (1).

Određivanje benzena u smjesi s drugim aromatskim ugljikovodicima, osobito toluena i ksilena iziskuje specijalne kemijske metode, a k tome dolazi još i poteškoća uzimanja reprezentativnog uzorka zraka iz radne atmosfere zbog velikih fluktuacija koncentracija. To je potaknulo toksikologe da određuju metabolitske produkte benzena u biološkom materijalu. Metabolitski produkti benzena su fenol, katehol, kinon, hidroksikinon, trans-trans mukuronska kiselina i L-fenil merkapturna kiselina (2). Fenolni produkti se izlučuju kao konjugirani sulfati ili glukuronidi, a izlučivanje fenola je završeno tokom prva 24 sata (1).

Još 1936. god. *Yant* i sur. (3) predlažu određivanje sulfata u urinu kao mjeru ekspozicije parama benzena, međutim *Teisinger* i *Fisherova-Bergerova*, 1955. (4) pokazali su da je određivanje fenola osjetljiviji test ekspozicije benzenu, nego određivanje sulfata. Oni su primijenili *Gibbsovu metodu* (5) s 2,6-diklorkinon-4-klorimidom na biološki materijal. *Walkley* i sur., 1961. god. (6) su pokazali da postoji linearna ovisnost između koncentracije benzena u zraku i izlučivanja fenola u urinu. Oni predlažu destilaciju fenola s vodenom parom iz sumporno kiselog urina i kolorimetrijsko određivanje koncentracije s p-nitroanilinom kao indikatorom. Međutim, ta metoda, kao i neke druge (7) i pored točnosti oko 1 µg fenola/lit. destilata, nisu dovoljno prikladne za tvorničke uvjete. Zbog toga smo odlučili ispitati semikvantitativni *Rainsford-Daviesov* test (1) i odrediti njegovu praktičnu vrijednost.

#### MATERIJAL I METODE

Semikvantitativni *Rainsford-Daviesov* test (1) je ispitan na urinima 50 radnika jedne zagrebačke tvornice lijekova, koji su bili eksponirani većim ili manjim koncentracijama benzena. Zbog brzog izlučivanja fenola svakom radniku je skupljen urin prije i poslije posla. Osim eksponirane grupe u ispitivanje je bila uključena i kontrolna grupa od 20 radnika iste tvornice, koji nisu bili u poznatoj ekspoziciji benzenu. Kod njih je analiziran urin samo po završetku posla. U svakom uzorku urina koncentracija fenola je određena semikvantitativnim testom (1) i pored toga kvantitativnom metodom *Walkleya* i sur. (6). S obzirom da su neki ispitanici bili kontrolirani dva i više puta, ukupno je analizirano 115 uzoraka urina eksponirane grupe i 20 uzoraka kontrolne grupe.

Semikvantitativni test *Rainsforda* i *Daviesa* temelji se na reakciji između fenola i 2,6-diklorkinon-4-klorimida, tzv. Gibbsovog reagensa, koji daju u lužnatom mediju plavo obojeni indofenol. Za taj test potrebne su ove reagencije:

Gibbsov reagens: 0,05% otopina 2,6-diklorkinon-4-klorimida u apsolutnom etilnom alkoholu

Boratni pufer pH 10,15, koji se dobije tako da se pomiješa 75,4 ml otopine natrijevog karbonata (2,65 g anhidričnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 500 ml vode) sa 24,6 ml otopine natrijevog tetraborata ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) (9,55 g u 500 ml vode)

60% perklorna kiselina

Etilni eter.

Test se izradi po ovom postupku: 1 ml urina i 0,4 ml 60% perklorne kiseline se otpipetira u epruvetu, dobro se začepi i stavi u do toga časa kipuću vodu kupelj; izvor topline se ukloni i epruveta se ostavi stajati 10 min., da bi se fenolni konjugati hidrolizirali. Zatim se naglo ohladi pod vodenim mlazom na sobnu temperaturu. Ekstrakcija se izvodi s po-

moću 4 ml etera, koji se dobro promućka sa sadržajem u epruveti i ostavi da se slojevi odijele. U udubinu (jamicu) porculanske pločice otpipetira se redom: 0,2 ml boratnog pufera, 0,1 ml eternog sloja uzorka, 0,05 ml Gibbsovog reagensa. Unutar tri minute razvije se plava boja, čiji intenzitet ovisi o koncentraciji fenola. Pozitivna reakcija je uvijek određeno plava. Standardna matična otopina fenola priređena je otapanjem 0,1 g kristalnog fenola u 100 ml svježeg urina, koji je dao negativnu reakciju na fenol.

### REZULTATI

Ispitivanjem testa na poznatim koncentracijama fenola u urinu, utvrđene su oznake intenziteta boje za pojedine koncentracije. Znakom  $\pm$  obilježen je intenzitet plave boje kod koncentracije 50 mg fenola/l, znak + kod 100 mg fenola/l, znak  $+\pm$  kod 150 mg fenola/l, znak ++ kod 200 mg fenola/l, znak  $++\pm$  kod 250 mg fenola/l i znak +++ kod 300 mg fenola/l urina. Koncentracije ispod 25 mg fenola/l urina obično nisu dale određenu plavu boju i mi smo ih bilježili kao negativne.

Slika 1 prikazuje razliku u intenzitetu boje jednog niza poznatih koncentracija fenola u urinu (sl. 1).



Sl. 2. Rezultati Rainsford-Daviesovog testa prema koncentraciji fenola određenog po Walkleyu i sur. u urinu prije i poslije posla kod radnika eksponiranih benzenu. Znak  $\pm$  odgovara intenzitetu boje standardne otopine od 50 mg fenola/l urina, znak +, 100 mg/l itd.

Rezultati semikvantitativnog testa uporedno s kvantitativnom analizom za sve ispitane uzorke eksponirane grupe prikazani su grafički na sl. 2. Vidljivo je da između intenziteta boje semikvantitativnog testa i kvantitativnog određivanja koncentracije fenola postoji dobra korelacija. Koncentracije fenola koje su povišene kvantitativno u pravilu su povišene i semikvantitativno (sl. 2).

Povezanost između ove dvije analize utvrđena je statistički  $\chi^2$  testom i koeficijentom korelacije C. Dobiveni rezultati za  $\chi^2 = 90,518$  i za  $C = 0,67$  pokazuju da je semikvantitativni test u vrlo dobroj korelaciji s kvantitativnom analizom. Kod kontrolne grupe kvantitativno je utvrđena koncentracija fenola u rasponu od 14 do 100 mg/l ( $M = 53 \pm 28$ ), a semikvantitativni test nije prelazio intenzitet boje koji odgovara znaku +.

Kod eksponirane grupe kvantitativno je utvrđena koncentracija fenola u rasponu od 3 do 92 mg/l ( $M = 37 \pm 21$ ) prije posla, odnosno u rasponu od 13 do 456 mg/l ( $M = 113 \pm 109$ ) poslije posla, a semikvantitativno ( $\pm$ ) što odgovara standardu 25 mg fenola/l, do +++( $\pm$ ) što odgovara standardu 325 mg fenola/l urina.

#### DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Semikvantitativni test po *Rainsford-Daviesu* je vrlo prikladna rutinska metoda za određivanje fenola u urinu kod ekspozicije parama benzena. Test je pouzdan i prema kvantitativnoj analizi je vrlo dobar indikator ekspozicije benzenu.

Vrijedno je naglasiti vlastito zapažanje da je za pravilno odvijanje reakcije između fenola i Gibbsovog reagensa važno paziti na čistoću apsolutnog etilnog alkohola. Alkohol mora biti bez vode i ne smije sadržavati druge primjese. Otopina Gibbsovog reagensa mora biti svjetlo žuta, a čim potamni ne može se više upotrebljavati. Pored toga, prema našem iskustvu, očitavanje treba vršiti tri minute nakon dodatka Gibbsovog reagensa. Radi lakšeg raspoznavanja razlike boja treba uz svaku analizu raditi test s poznatim koncentracijama fenola u urinu. Test je vrlo jednostavan, lako ga izvodi i priučena osoba. Taj način detekcije povećane ekspozicije benzenu je vrlo pogodan za tvorničke ambulante. Osim uvida u individualnu ekspoziciju semikvantitativni test omogućava vrlo dobar uvid u grupnu ekspoziciju parama benzena. Naime, ekspozicija od osam sati pri 25 ppm benzenu u zraku rezultira u izlučivanju 200 mg fenola/l urina, računato na spec. težinu 1,024 odnosno 150 mg fenola/l urina ako se računa na specifičnu težinu 1,016 (1). Prema MDK (JUS, Z. B. O., 0,01, VII 1964. g.) od 15 ppm benzenu odgovara 120 mg fenola/l urina, a ta je koncentracija označena znakom + i jasno se može razlikovati od negativne reakcije.

*Literatura*

1. Rainsford, S. G., Lloyd Davies, T. A.: Brit. J. Ind. Med., 22 (1965) 21.
2. Porteous, J. W., Williams, R. T.: Biochem. J., 44 (1949) 46.
3. Jant, W. P. i sur.: J. Ind. Hyg. Toxicol., 18 (1936) 69
4. Teisinger, J., Fisherova Bergerova: Arch. Malad. Prof., 16 (1955) 221.
5. Gibbs, H. D.: J. Biol. Chem., 72 (1927) 649.
6. Walkley, J. E. i sur.: Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 22 (1961) 362.
7. Buchwald, H. D.: Ann. Occup. Hyg., 9 (1966) 7.

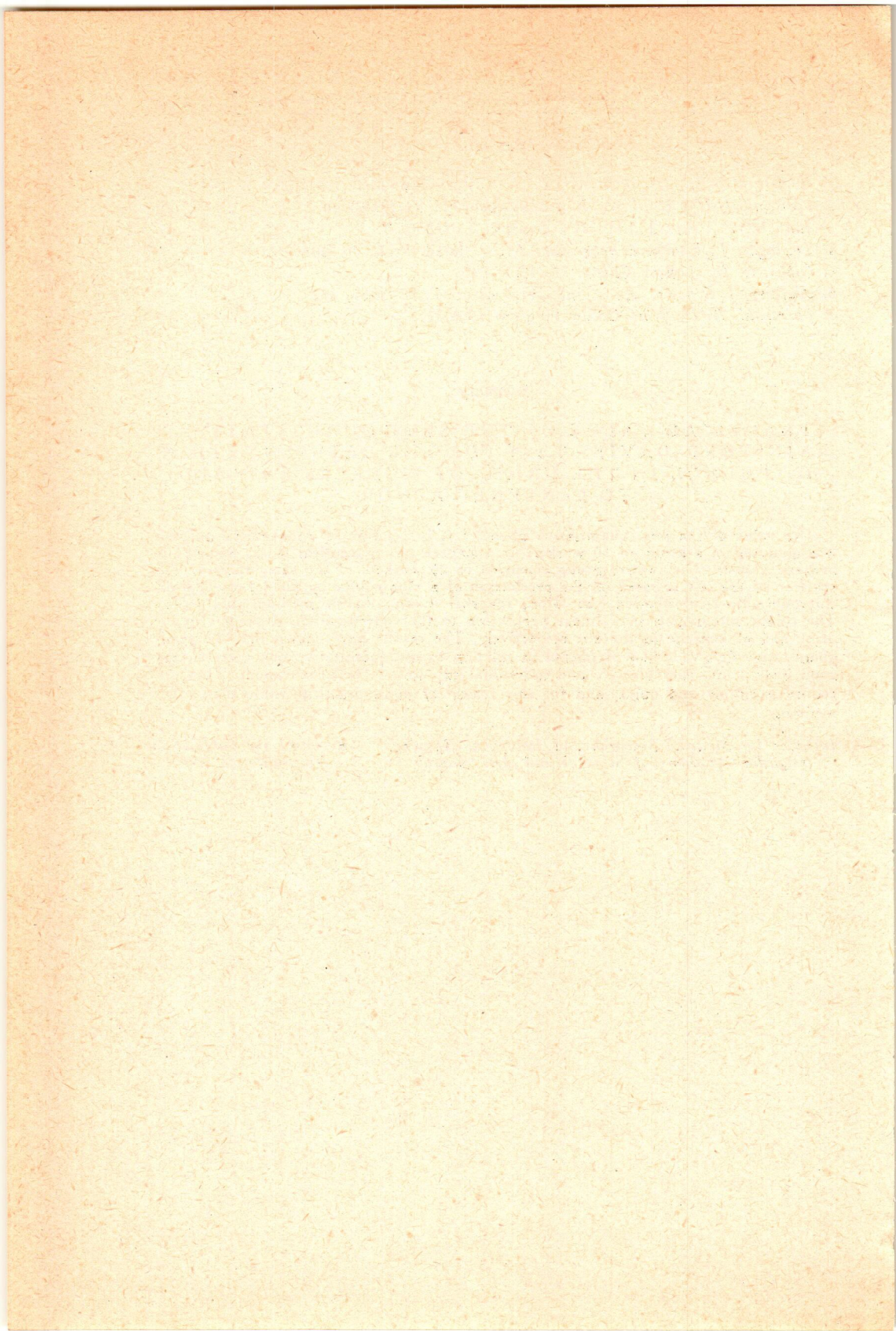
*Summary*

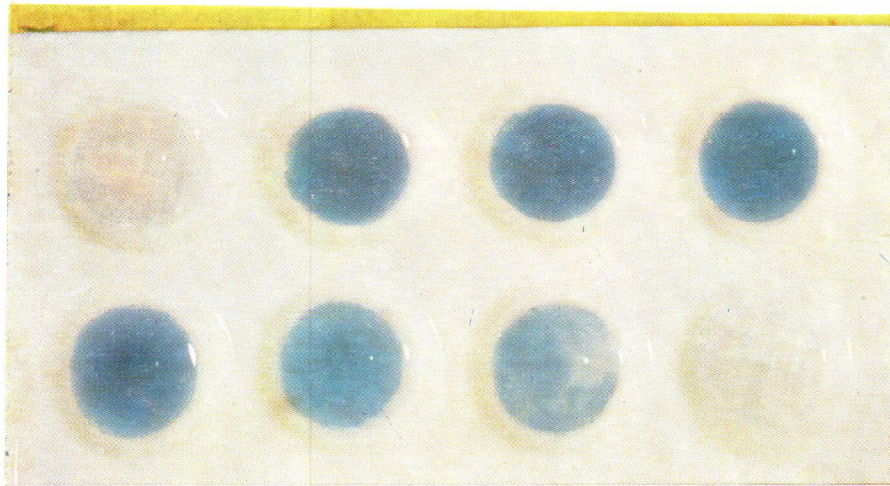
PRACTICAL VALUE OF THE SEMI-QUANTITATIVE  
RAINSFORD-DAVIES TEST FOR THE DETERMINATION  
OF PHENOL IN THE URINE OF WORKERS EXPOSED  
TO BENZENE VAPOUR

The value of the semi-quantitative phenol test in relation to quantitative analysis was analysed in a group of 50 workers of a Zagreb pharmaceutical works exposed to benzene vapour. The control group consisted of 20 workers of the same factory. The reaction of the test is based on the production of a blue colour by phenol and 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (the Gibbs reagent) in an alkaline medium (pH 10.15). The colour intensity is in a linear proportion to the concentration of phenol in the urine and of benzene in the air, respectively. The results have shown that the semi-quantitative determination of phenol in relation to the quantitative one gives a very good insight into the collective and individual exposure to benzene vapour. The procedure is simple and quick, and for this reason of more practical value than other methods.

*Institute for Medical Research and Industrial Hygiene,  
Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb*

*Received for publication  
November 23, 1967*





Sl. 1. Obojena reakcija Rainsford-Daviesovog testa standardnih otopina fenola u urinu

Neg., +++, 300 mg/l; ++±, 250 mg/l; ++, 200 mg/l;  
+±, 150 mg/l; +, 100 mg/l; ± 50 mg/l; neg.