**OZNACZANIE p-AMINOFENOLU W MOCZU**

P-aminofenol jest wskaźnikiem narażenia na nitrobenzen i anilinę. U osób stykających się zawodowo m.in. z aniliną czy nitrobenzenem stężenie p-aminofenolu w moczu wynosi 10-150 mg/l, przy czym stężenie fizjologiczne nie przekracza 3,5-3,7 mg/l. Związany z kwasem siarkowym lub glukuronowym p-aminofenol uwalnia się na drodze kwaśnej hydrolizy i można go oznaczyć kolorymetrycznie po sprzęgnięciu z fenolem. Powstały indofenol wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali λ = 620 nm.

**ODCZYNNIKI**

1. Woda amoniakalna cz.d.a.
2. 5% wodny roztwór fenolu
3. 36% HCl
4. Wzorcowy r-r p-aminofenolu: 10 mg p-aminofenolu rozpuścić w 3 ml stęż. kwasu solnego

i uzupełnić wodą do 100 ml **(1 ml roztworu wzorcowego zawiera 0,1 mg p-aminofenolu)**

Rozcieńczenia roztworu wzorcowego p-aminofenolu do wykonania krzywej standardowej:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **stęż. p-aminofenolu [µg/ml]** | **1,0** | **2,0** | **3,0** | **5,0** | **10,0** | **Próba odczynnik.** |
| 0,1 mg/ml wzorzec  p-aminofenolu [μl] | 10 | 20 | 30 | 50 | 100 | - |
| H2O MQ [µl]  uzupełnić wodą do 1000 µl | 990 | 980 | 970 | 950 | 900 | 1000 |
| 36% HCl [µl] | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

**KRZYWA WZORCOWA**

Otrzymane próbki rozcieńczeń roztworów wzorcowych należy wymieszać. Następnie dodać kolejno 0,5 ml 5% fenolu, 1 ml wody amoniakalnej oraz 2,5 ml wody destylowanej. Po każdorazowym dodaniu odczynnika, próbki zwortexować. Pozostawić na 30 minut w temp. pokojowej celem wywołania reakcji barwnej. Pomiar absorbancji odczytać spektrofotometrycznie przy długości fali λ = 620 nm wobec próby odczynnikowej. Należy wykreślić krzywą: A = f /stężenie p-aminofenolu w µg/ml.

**ANALIZA**

Otrzymaną próbkę (1 ml) o stężeniu 1 mg/ml rozcieńczyć 10x przez dodanie 9 ml wody dejonizowanej, następnie zakwasić 0,5 ml 36% HCl i zwortexować. Inkubować w łaźni wodnej 30 minut w temp. 100ºC. Pobrać 1 ml próbki i dodać 0,5 ml 5% fenolu, 1 ml wody amoniakalnej oraz 2,5 ml wody destylowanej. Następnie wymieszać i pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej celem wywołania reakcji barwnej. Pomiar absorbancji odczytać spektrofotometrycznie przy długości fali λ = 620 nm wobec próby odczynnikowej.