**OZNACZANIE KWASU HIPUROWEGO**

**ZASADA METODY:**

Ocena narażenia na toluen opiera się na oznaczaniu zawartości kwasu hipurowego w moczu zebranym między 4 a 8 godziną ekspozycji. Zasada oznaczenia polega na utworzeniu aminowej pochodnej kwasu hipurowego w wyniku reakcji z aldehydem p-dimetyloaminobenzoesowym, kwasu p-aminohipurowego (PAH), który w obecności jonów Fe3+ tworzy barwny kompleks w obecności bezwodnika octowego.

**ODCZYNNIKI:**

1. 1,5 % roztwór aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego (ADAB) w bezwodniku octowym
2. 0,16 % roztwór FeCl3 w bezwodniku octowym
3. 96% alkohol etylowy cz.d.a.
4. Octan etylu cz.d.a.
5. Wzorzec kwasu hipurowego 50mg/100ml wody destylowanej

**MATERIAŁ BADANY:** mocz rozcieńczony 10 razy.

**WYKONANIE OZNACZENIA:**

1. **Krzywa wzorcowa**:

Do probówek dodać odpowiednie ilości r-ru wzorcowego, kwasu hipurowego oraz wody według poniższej tabeli, a następnie dokładnie wymieszać.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Lp.** | **Stężenie**  **[mg/ml]** | **R-r wzorcowy kwasu hipurowego**  **[ml]** | **Woda dejonizowana**  **[ml]** | **A**  **λ = 510nm** |
| 1 | próba odczynnikowa | - | 0,50 |  |
| 2 |  | 0,05 | 0,45 |  |
| 3 |  | 0,10 | 0,40 |  |
| 4 |  | 0,15 | 0,35 |  |
| 5 |  | 0,20 | 0,30 |  |
| 6 |  | 0,25 | 0,25 |  |

Następnie:

1. Dodać 2,5 ml octanu etylu i ekstrahować poprzez wytrząsanie przez 1 min.
2. Pobrać 0,5 ml warstwy octanu etylu do eppendorfek i odparować do sucha w termobloku (100°C, 30min.).
3. Do suchej pozostałości dodać 0,25 ml roztworu ADAB (wymieszać) oraz 0,25 ml roztworu FeCl3 (wymieszać)*.*
4. Eppendorfki zamknąć i ogrzewać w termobloku (100°C, 10min.).
5. Po oziębieniu (10 min.) dodać 2 ml etanolu i dokładnie wymieszać.
6. Po upływie 10 min. zmierzyć absorbancję roztworów standardowych względem próby odczynnikowej przy długości fali 510 nm.

1. **Próba badana i odczynnikowa**

*Uwaga! Do odczytania prób badanych przygotować próbę odczynnikową.*

Z próbą badaną i odczynnikową postępować wg instrukcji zamieszczonej powyżej (punkt 1-6).

1. **Obliczenia**

Oblicz stężenie kwasu hipurowego w badanej próbce uwzględniając rozcieńczenie badanego materiału. Zinterpretuj wynik wiedząc, że stężenie 1,6 mg/ml jest toksyczne.