

Trichloroethylene ile Çalışanların İdrarlarında Trichloroacetic ve Trichloroethanol'ün Kantitatif Olarak Tayini Üzerinde Çalışmalar

Studies on Quantitative Determinations of Trichloroacetic Acid and Trichloroethanol in Urine Who Exposed to Trichloroethylene

Urhan YUMUTURUĞ* — Herman A. ELLENBERGER**

Bugün, piyasada birçok sinonimleri (Trichloroethene, Ethinyl Trichloride, Ethylene Trichloride, Acethylene Trichloride) ile birlikte geniş bir tatbik sahası bulan Trichloroethylene, kurutemizleme, gazların saflaştırılmasında, madenlerin cilalanmasında, ekstraksiyon solventlerinin hazırlanmasında, soğutma tesislerinde, deri, tekstil, boya ve kauçuk sanayiinde ve matbaacılıkta çok kullanılmaktadır. Parlayıcı olmayan, çok uçucu, hoş kokulu, berrak ve renksiz bir sıvı olan Trichloroethylene'in bu madde ile çalışan insanlar için bir tehlike kaynağı olduğu çok eskiden tesbit edilmiştir.

Trichloroethylene'in solunum, sindirim ve deri yollarından zehirleyici etkisi, merkezi sistemi üzerinde depresif tesiri olduğu, Ventriküler fibrilasyona yol açtığı, Karaciğer ve böbreklerde tahribat yaptığı bildirilmiştir.

Zehirlenme belirtileri ve semptomlarını şu şekilde sıralayabiliriz : Lokal olarak alındığı zaman : Konjoktivitis, dermatitis ve neuronosis, sindirim sistemi yolu ile alındığı zaman : Ağız ve yemek borusunda yanma bulantı, kusma, karın ve baş ağrısı, vertigo, kolaps, şuur kaybı, konvulsyon ve parestizi, Solunum yolu ile alındığı zaman : Burun ve nefes borularında iritasyon, solunumun süratlenmesi, bronşit, akciğer ödemi, iştahsızlık, bulantı, kusma, baş ağrısı,

Redaksiyona verildiği tarih : 11 Haziran 1974

(*) Resident in Dept. of Pathology, Clinical Chem. Div. Dalhousie University, Medical School, Halifax, Nova Scotia, CANADA.

(**) Associate Pathologist, Head of Toxicology Div., Dep. of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, CANADA.

karaciğerde az dahi olsa büyüme, vertigo, aşırı hassasiyet, uykusuzluk, ruhi bozukluk, nistagmus, uyuşma, periferik nevritis, prekordial ağrılar, aritmi ve konvulsiyonlar. Daha ileri durumda retrobulbar nevritis, renk ayırımında bozukluk ve optik atrofi görülmektedir.

M E T O T

Trichloroethylene zehirlenmelerini tesbit konusunda uzun yıllardan beri çalışmalar yapılmış ve idrardaki miktar tayini dolaylı olarak başarılmıştır. Son olarak 1970 yılında İngiltere'de yayınlanan bir tıbbî mecmuada (1) Ogata M., Takatsuka Y., ve Tomokuni K. adlarında üç Japon bilim adamı işyerinde Trichloroethylene'e maruz kalan işçilerinin idrarlarında Trichloroacetic asit ve Trichloroethanol tayinini gösteren basit bir metod yayınlamışlardır.

Metodun esası şudur : Trichloroethylene vücuda girdikten sonra birtakım metabolik reaksiyonlar sonucu Trichloroacetic asit ve Trichloroethanol'e dönüşür. Bu metabolizma mahsulleri idrarla ve glucuronic aside bağlı olarak itrah edilirler. Bu bileşikler β -Glucuronidase enzimi ile hidrolize edildiklerinde serbest kalırlar ve serbest kalan Trichloroacetic asit ve Trichloroethanol pyridin ve potasyum hidroksit ile muamele edilerek 100°C de 3,5 dakika tutulursa renk teşekkülü olur. Teşekkül etmiş olan bu renk, spektrofotometrede 440 ve 530 nm dalga boylarında ölçülür. Bu metod ile bulunan değerler daha önceden ortaya konmuş bulunan fakat daha uzun zamana ihtiyaç gösteren ve bir takım ekstra işlemleri gerektiren metodlarla bağdaşmaktadır.

Yapmış olduğum çalışmalarda her ne kadar yukarıda adları yazılı şahısların ortaya koymuş oldukları metodu aynen tatbik ettiysem de çalışmalarım neticesinde bazı modifikasyonların da faydalı olduğu sonucuna vardım.

Yapılmış olan modifikasyonlarla beraber metod, ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

Prensip :

Klor ihtiva eden organik bileşikler pyridin ve alkali ile beraber ısıtılırsa pembe bir renk teşekkül eder. Bu pembe şiddeti ve absorpsiyon özelliği organik bileşiğin çinsine göre değişir.

Gerekli Reaktifler :

1 — 0.15 M. Fosfat buffer (pH : 6.0).

Hazırlanışı : 11.87 gr. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ veya 9.47 gr. Na_2HPO_4 anhdr. 1 litre suda eritilir. Ayrıca 9.08 gr. KH_2PO_4 1 litre suda eritilir. Daha sonra 12 cc Na_2HPO_4 reaktifi 88 cc. KH_2PO_4 reaktifi ile karıştırılarak 100 cc. 0.15 M. fosfat buffer hazırlanmış olur. pH 6.0 olmalıdır. Olmadığı takdirde ayarlanmalıdır.

2 — β -Glucuronidase + fosfat buffer karışımı :

Hazırlanışı : 0.15 M. fosfat buffer ile β -glucuronidase enzimi beher cc. de 500 ünite β -glucuronidase olacak şekilde karıştırılarak hazırlanır.

3 — Pyridine :

Analitik maksatlar için hazırlanmış nitelikte olmalıdır.

4 — 10 N KOH :

Hazırlanışı : 56.1 gr. KOH 100 cc. suda eritilerek hazırlanır.

5 — Pyridine + H_2O karışımı :

Hazırlanışı : Eşit hacimlerde pyridine ve H_2O karıştırılarak hazırlanır.

6 — Trichloroacetic asit standardı :

Hazırlanışı :

a) 1.0 gr. kuru, analitik nitelikte TCA (Trichloroacetic asit) 100 cc. lik balona konur ve distile su ile 100 cc. e tamamlanır (Not : 2 okuyun). Bu solüsyonu No.1 olarak işaretleyin No.1 solüsyonu konsantrasyonu 10 mg/cc dir ve buz dolabında 1 ay müddetle dayanıklıdır.

b) 5 cc. No. 1 solüsyonu distile su ile 100 cc e tamamlanır. Bu solüsyon da No. 2 olarak işaretlenir ve konsantrasyonu 500 microgr/cc dir.

c) 1.0 cc No. 2 solüsyonu idrar ile (Not : 3 okuyun) 50 cc e tamamlanır ve konsantrasyon 10 microgr/cc olmuş olur.

d) 1.0 cc No. 2 solüsyonu idrar ile 25 cc e tamamlanır ve konsantrasyon 20 microgr/cc olur.

e) 1.0 cc No. solüsyonu idrar ile 10 cc e tamamlanır ve konsantrasyonu 50 micgrogr/cc olur.

f) 2.0 cc No. solüsyonu idrar ile 10 cc e tamamlanır ve konsantrasyon 100 microgr/cc olur.

Teknik :

1 — 10, 20, 50 ve 100 microgr/cc lik standart solüsyonlardan 1.0 cc alınarak ayrı ayrı tüplere konur ve işaretlenir. Ayrı bir tüp de kör olarak kullanılmak üzere 1.0 cc idrar konur.

2 — Bütün tüplere 1.0 cc 0.15 M. fosfat buffer ilave edilir.

3 — Bütün tüplere 1.0 cc β -glucuronidase + 0.15 M. fosfat buffer karışımından ilâve edilir.

4 — İyice karıştırılır. Mümkünse mekanik karıştırıcı kullanılır.

5 — 37°C \pm 2°C de en az 40 dakika tutulur.

6 — Bu esnada 250 cc veya 400 cc lik bir beher glas kaynar su ile doldurulup kaynar vaziyette ilerdeki işlemler için hazırlanır.

7 — Ayrı test tüplerine 5.0 cc pyridin konur.

8 — 37°C de en az 40 dakika tutulmuş olan karışımlardan 1.0 cc alınarak madde 7 de hazırlanmış olan tüplere ilâve edilir ve tüpler işaretlenir.

9 — Bütün tüplere 2.0 cc 10 N. KOH ilâve edilip mümkün ise vortex ile iyice karıştırılır. (Not : 4).

10 — Tüpler derhal daha önceden hazırlanmış kaynar su içine konarak tam 3.5 dakika beklenir.

11 — Kaynar sudan çıkartılan tüpler derhal buzlu su içine konur.

12 — Yüksek devire dayanıklı santrifüj tüplerine 0.5 cc distile su, 3.4 cc pridine + H₂O karışımı ve 3.5 cc de buzlu su içinde sakla-

nan tüplerdeki pembe renkli pyridin tabakasından konarak iyice karıştırılır ve 10.000 r.p.m de 10 dakika santrifüje edilir. Santrifüje edildikten sonra bu karışım tamamen berrak olmalıdır.

13 — Bu berrak karışım küvetlere konarak scanning spectrophotometre'de 600 mm dalga boyundan 300 nm dalga boyuna kadar grafiği çizilir.

14 — Teşekkül etmiş olan pembe renk 30 dakika müddetle stabildir.

15 — Her standard, 368 nm de, scann eğrisinde en yüksek noktaya erişirler. Bu noktalar düz bir grafik kâğıdı üzerine işaretlenir. İşaretli noktaları birleştiren doğru parçası standart kurbunu meydana getirir.

16 — İdarda TCA tayini için yapılan işlem, Standard için yapılan işlemin aynıdır. Kör olarak ya H₂O veya daha iyisi TCA ihtiva etmediğinden emin olunan idrar kullanılır.

17 — Netice, bulunan değer standard eğriden karşılığını bularak elde edilir.

18 — Tetkik edilen nümunenin değeri daha önceden hazırlanmış olan standartları değerlerinden yüksek ise ya idrar uygun nisbetlerde sulandırılır veya daha yüksek değerlerde standartlar hazırlanarak standart eğrisi uzatılır.

19 — Netice mg/L olarak verilir. ve «Bu değer total trichloro bileşiklerini ifade eder» şeklinde bir not ilâve edebilir.

NOT :

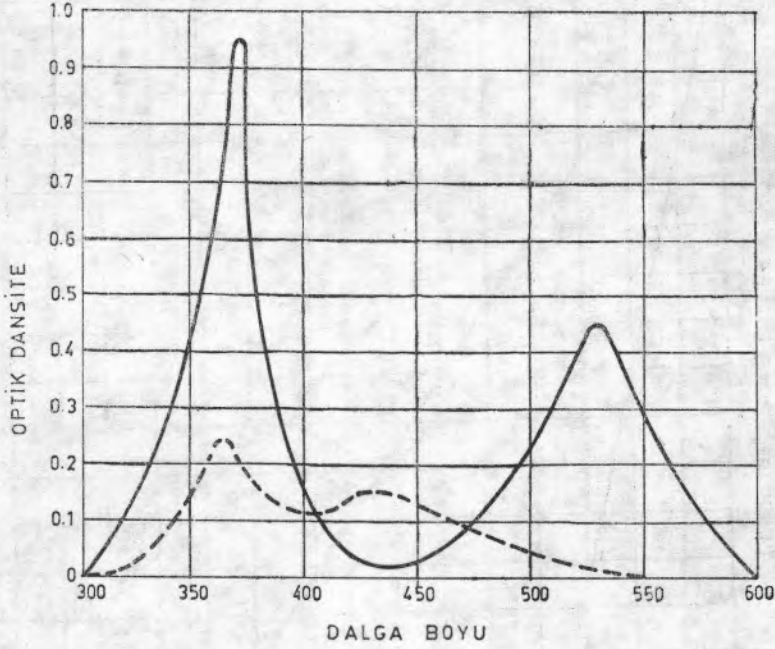
1 — TCA ve TCE (Trichloroethanol) vücuda giren Trichloroethylen ve chloral hydrate ın metabolizma mahsulleridir. Yapılan araşirmalarda idrarda TCA ve TCE birlikte buldukları zaman bunların ayrı ayrı tesbit etmek mümkün olamamaktadır. Aynı zamanda her birinin miktarı Trichloroethylen'in vücuda girmesi ile idrar nümunesinin alınması arasında geçen zamana bağlı olarak değişmektedir.

Grafik (No. 1) te görüldüğü gibi hem TCA hemde TCE 530 nm ye 430 nm dalga boylarında ikinci birer pik daha meydana getirmekte hemde yine her ikisi 368 nm dalga boyunda diğerine nisbetle daha yüksek bir absorbans göstermektedirler. 368 nm dalga boyunda ki bu pik miktar tayininde kullanılmaktadır.

2 — TCA çok higroskopik bir cisim olduğu için kurutmak ve kuru olarak muhafaza edebilmek çok zordur. Bu bakımdan hiç açılmamış bir şişeden % 100 lük bir sulandırma yapmak ve bunu standart hazırlamada kullanmak daha uygun olur.

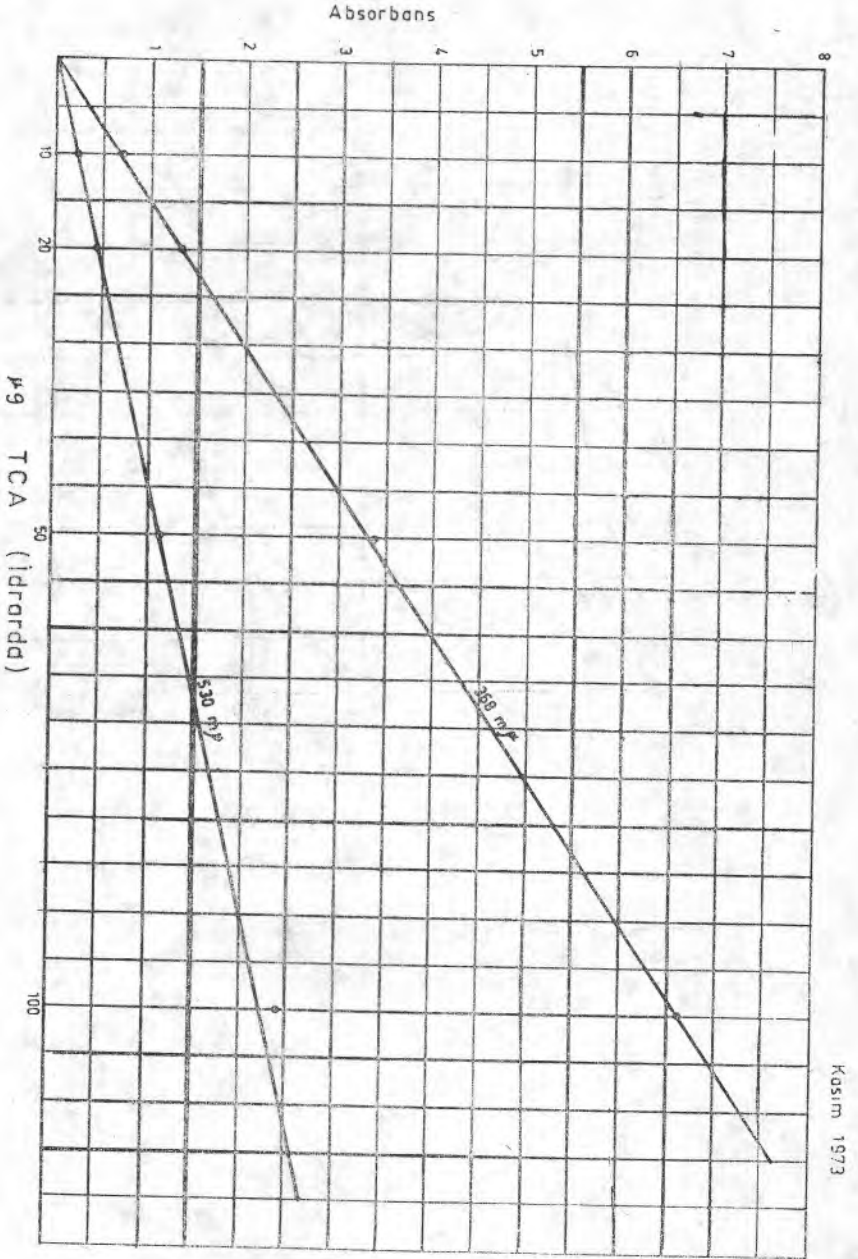
3 — Standart hazırlanırken kullanılacak idrarın klor ile bağlantısı olan organik bileşiklere maruz kalmamış olduğuna emin olunan kimselerden teminine dikkat edilmelidir.

4 — Bu basamaktan 11 inci basamağın sonuna kadar olan işlemlerde zamanı çok hassas olarak takip etmek gerektir. Herhangi bir sebeple bir müddet beklemek gerektiği takdirde ancak 13 üncü basamaktaki sulandırma yapıldıktan sonra 30 dakika içinde işlem tamamlanabilir. Yaptığım tetkiklerde teşekkür eden rengin 30 dakika müddetle sabit kaldığı görülmüştür.

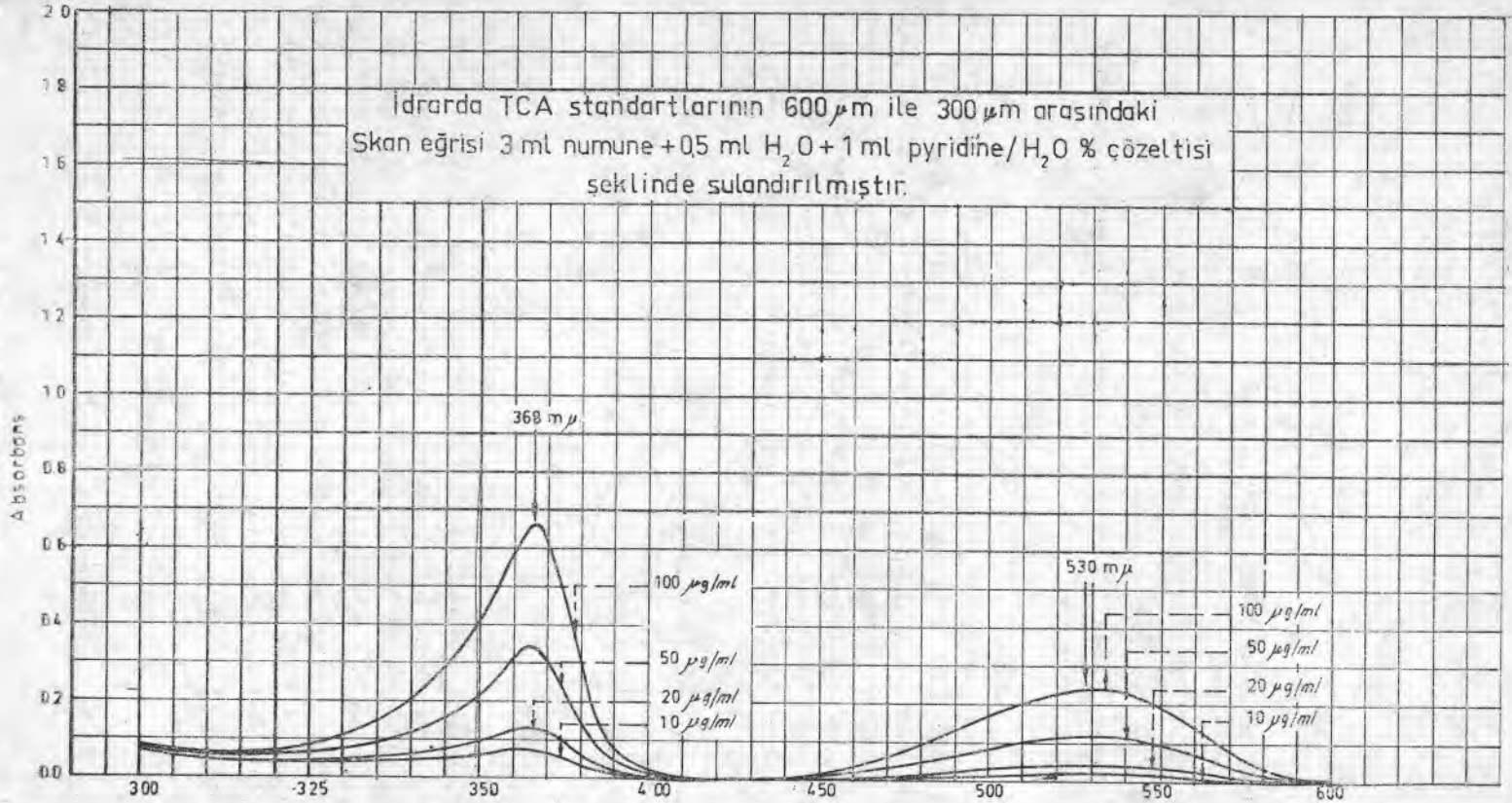


GRAFİK I : TCA ve TCE nin
Absobpsiyon spektrumu

- TCA (Trichloroacetic asit)
- - - TCE (Trichloro ethanol)



Grafik : 2 — Kalibrasyon Eğrileri



Ö Z E T

Bilhassa meslekî çalışmalar esnasında muhtelif yollardan vücuda giren Tricholorethylene ve Chloralhydrate bir takım metabolizma reaksiyonları neticesi Trichloroacetic acid ve Trichloroethanol'e dönüşmekte ve idrarla vücuttan itrah edilmektedir. İtrah olunan bu klorlanmış organik maddeler sıcak vasatta alkali ve pyridine ile muamele edildiğinde pembe bir renk husule gelmektedir. 30 dakika müddetle stabil olan bu renk 530 nm ve 368 nm dalga boylarında 2 pik vermektir. 368 nm dalga boyundaki pik miktar tayini için kullanılmaya daha elverişlidir.

S U M M A R Y

Chlorinated organic compounds in the presence of pyridine, alkali and heat produce a purple coloured complex, the intensity and absorption characteristics of which vary from compound to compound.

TCA and TCE are metabolites of trichloroethylene and chloral hydrate intake. In developing the method of analysis, it was found to be impossible to determine each separately when present in combination. The amount of each will vary with the interval of time between ingestion and taking of sample. While TCA has a secondary peak at 530 nm and TCE at 430 nm, both have an increased absorbance at 368 nm. This latter peak is used for quantitation.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Ogata M., Takatsuka Y., Tomokuni K., Muroi K. : *Brit. J. Industr. Med.* **27**, 378 - 381, 1970
- 2 — Borker E., Stefanucci A.; Vittì J. : *Analytical Chemistry* **35**, 1321 - 1322, 1963
- 3 — Soucek B.; Vlachova D. : *Brit. J. Industr. Med.* **17**, 60 - 64, 1960
- 4 — Butler, T. C. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **97**, 84 - 92, 1949