



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko - biokemijski fakultet

Josipa Periša i Marko Tijardović

**Određivanje niskih koncentracija etanola (< 0,5 g/L) u slini, serumu i urinu nakon konzumacije alkoholnih pića**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu i u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ravnateljstva policije u Ministarstvu unutarnjih poslova Republike Hrvatske, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Etanol .....	1
1.1.1.	Svojstva molekule .....	1
1.1.2.	Farmakodinamika i farmakokinetika etanola .....	1
1.2.	Analitičke metode za mjerenje koncentracije etanola u tjelesnim tekućinama .....	3
1.2.1.	Vrste uzoraka.....	3
1.2.2.	Izražavanje koncentracije .....	4
1.2.3.	Referentna metoda i njezina primjena .....	4
1.2.4.	Metode u medicinskoj praksi.....	6
1.3.	Društvena, medicinska i pravna gledišta na učinak alkohola .....	7
1.3.1.	Društveno i kulturološko poimanje pijenja alkohola.....	7
1.3.2.	Medicinsko stajalište - organski i psihički poremećaji.....	8
1.3.3.	Pravni okviri – prekršaji u prometu i na radnom mjestu .....	10
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	11
3.	MATERIJALI I METODE.....	12
3.1.	Materijali .....	12
3.1.1.	Kratka pilot studija s čokoladnim pralinama .....	12
3.1.2.	Ispitanici .....	12
3.1.3.	Konzumacija alkohola i dinamika uzorkovanja .....	12
3.1.4.	Uzorkovanje krvi.....	13
3.1.5.	Uzorkovanje sline.....	13
3.1.6.	Uzorkovanje urina .....	13
3.1.7.	Stabilnost uzoraka .....	14
3.2.	Metode.....	14
3.2.1.	Enzimatska metoda.....	14
3.2.2.	Plinska kromatografija (GC-HS-FID) – referentna metoda .....	15
3.2.3.	Metode procjene utjecaja etanola na ispitanike .....	17
3.2.4.	Statistička metoda.....	17
4.	REZULTATI .....	19
4.1.	Kratki pilot pokus s čokoladnim pralinama.....	19
4.2.	Pokus sa pijenjem alkoholnog pića .....	19
4.2.1.	Kinetika etanola.....	23
4.2.2.	Objektivni i subjektivni utjecaj etanola na ispitanike.....	25
4.2.3.	Usporedba enzimske i kromatografske metode u uzorcima sline, seruma i urina.....	26
4.2.4.	Povezanost koncentracije etanola u slini i serumu u odnosu na metodu.....	28

4.2.5.	Povezanost koncentracije etanola u urinu s koncentracijama u krvi i slini u odnosu na metodu	29
4.2.6.	Usporedba koncentracija etanola u odnosu na spol i tjelesnu masu	30
5.	RASPRAVA	32
5.1.	Čokoladne praline	32
5.2.	Kinetika etanola	32
5.3.	Usporedba metoda	33
5.4.	Usporedba uzoraka	34
5.4.1.	Slina i serum	34
5.4.2.	Urin sa slinom i serumom	35
5.5.	Ovisnost o spolu i tjelesnoj masi	36
6.	ZAKLJUČAK	37
7.	ZAHVALE	38
8.	LITERATURA	39
9.	SAŽETAK	42
10.	SUMMARY	43
11.	ŽIVOTOPISI	46

**Popis kratica:**

CNS, engl. central nervous system – središnji živčani sustav

GABA, engl.  $\gamma$ -aminobutyric acid –  $\gamma$ -amino-butirična-kiselina

NMDA, engl. N-methyl-D-aspartate – N-metil-D-aspartat

ADH, engl. alcohol dehydrogenase – alkohol-dehidrogenaza

CYP2E1, engl. Cytochrome P450 2E1 - citokrom P450 2E1 oksidaza

FID, engl. flame ionization detector – plamenoinizacijski detektor

TCD, engl. thermal conductivity detector – detektor termalne provodljivosti

GC-HS, engl. Gas Chromatography-Head Space – Head space plinska kromatografija

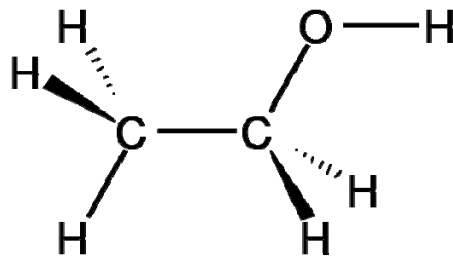
GC-HS-FID, engl. Gas Chromatography - Head Space-Flame Ionization Detector - Head space plinska kromatografija sa plamenoionizacijskim detektorom

## 1. UVOD

### 1.1. Etanol

#### 1.1.1. Svojstva molekule

Etanol (etilni alkohol) je mala molekula građena od devet atoma, opće formule  $C_2H_5OH$  i molekularne mase 46.06844 g/mol (Slika 1.). Jednostavna građa molekule i odsutstvo naboja pri fiziološkom pH omogućuje joj prolazak kroz stanične membrane, zbog čega se nakon konzumacije etanol i njegovi metaboliti mogu pronaći u gotovo svim tkivima. Hidroksilna skupina čini molekulu polarnom, stoga se etanol dobro miješa s vodom u svim omjerima i služi kao polarno otapalo. Osim s vodom dobro se miješa i s drugim organskim otapalima poput etil-etera, acetona i kloroforma i topljiv je u benzenu. Etanol i voda tvore azeotropnu smjesu pri 97% volumnom udjelu etanola pri 25°C i standardnom atmosferskom tlaku (1).



Slika 1. Molekula etanola

#### 1.1.2. Farmakodinamika i farmakokinetika etanola

Farmakodinamika etanola pokazuje utjecaj etanola na više metaboličkih putova u organizmu stoga učinak nije jednoznačajan. Etanol se koristi kao baktericidno i antifugalno sredstvo jer uzrokuje oštećenje stanica dehidracijom i precipitacijom citoplazme (protoplazme).

U ljudskom organizmu iznimno je važan njegov utjecaj na središnji živčani sustav (CNS, engl. central nervous system). Etanol mijenja svojstva membrane neurona, utječe na enzime i veže se na receptore za acetilkolin, serotonin, GABA receptore (GABA, engl.  $\gamma$ -aminobutiric acid), glicinske i NMDA receptore (NMDA, N-metil-D-aspartat) mijenjajući njihove primarne funkcije (2,3,4). Etanol je jedan od napoznatijih depresora središnjeg živčanog sustava.

U *in vitro* uvjetima etanol se veže kao agonist i potencira prolazak kloridnih iona kroz inhibitorne GABA receptore u postsinaptičkim neuronima što se očituje u pojačanoj depresiji CNS-a tj. sedativnom učinku etanola.

Etanol se veže na glicinske receptore koji se kao inhibitorni receptori pojavljuju u pojedinim regijama CNS-a. Glicinski receptori su o ligandu ovisni kloridni kanali iz porodice nikotin-acetilkolinskih

receptora. Otvaranjem kanala dolazi do ulaska  $\text{Cl}^-$  iona u neuron i do smanjenja praga okidanja odnosno podražljivosti neurona. Kinetički model prikazuje mehanizam djelovanja etanola: smanjujući brzinu odvajanja glicina s receptora, etanol uzrokuje istovremeno otvaranje većeg broja glicinskih receptora čime dolazi do smanjenja ekscitacijskog praga neurona. Posljedično imamo promjene ponašanja i gubitak refleksa uspravljanja kod pokusnih životinja (4).

NMDA receptori su o ligandu ovisni ionski kanali i imaju različita regulatorna mjesta: mjesto za vezanje glutamata, glicina, poliamina (rezultira ekscitacijom neurona) i iona magnezija (inhibicija neurona, veže se na otvorene kanale). Otvaranjem NMDA receptorskog ionskog kanala dolazi do influksa kalcijevih iona u stanicu i ekscitacije neurona. Etanol kompetira s glicinom za vezno mjesto i pritom blokira učinak glicina čime smanju ekscitaciju neurona. Drugi predloženi mehanizam je vezanje etanola u hidrofobni džep ionskog kanala koji time blokira kanal i on postaje neosjetljiv na promjene napona (3).

Farmakokinetika etanola u uskoj je vezi s njegovim molekularnim obilježjima. Etanol je tipičan primjer supstance čija kinetika slijedi kinetiku nultog reda što podrazumijeva da su apsorbirane i eliminirane količine neovisne o početnoj koncentraciji te da se u svakom vremenskom intervalu podjednako smanjuje koncentracija (5). Zbog male molekularne mase lako prolazi stanične membrane, brzo se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i raspodjeljuje u gotovo sva tkiva. Primarno mjesto apsorpcije je tanko crijevo, premda se dio etanola apsorbira i iz želudca. Konzumacija hrane neposredno prije uzimanja alkohola smanjuje njegovu apsorpciju pa je maksimalna koncentracija etanola u krvi očekivano niža nego kod konzumacije etanola natašte. Budući da se zbog polarne hidroksilne skupine dobro miješa s vodom, očekivano ga nalazimo u svim tjelesnim tekućinama. Prolazi placentu kod trudnica i može izazvati tkz. fetalni alkoholni sindrom. Tako se može određivati iz krvi, iz sline, urina ili drugih tjelesnih tekućina. Prilikom određivanja etanola iz sline treba na umu imati razlike sastava sline i krvi. Slina sadrži veći udio vode i manji udio lipida stoga je koncentracija etanola tijekom faze apsorpcije veća u slini. Kod žena je apsorpcija etanola manja nego kod muškaraca nakon oralne ingestije istih količina etanola (6).

Nakon faze apsorpcije slijedi faza distribucije etanola po tkivima. Koncentracija etanola u stanici ovisi o fazi (apsorpcija, eliminacija) i prokrvljenosti tkiva. Volumen distribucije je velik, a distribucija najveća u dobro prokrvljenim tkivima kao što su mozak, bubreg, pluća i salivarne žlijezde, dok je protok kroz mišiće u mirovanju daleko manji (7). Stoga etanol iz sline u fazi apsorpcije bolje prikazuje arterijsku koncentraciju etanola nego vensku.

Etanol se ne veže na proteine plazme, eliminira se dijelom nepromijenjen bubrezima, dijelom se izdiše, dok se dio metabolizira enzimima prilikom prvog prolaska kroz jetru. Najvažniji enzimi u metabolizmu etanola su alkohol-dehidrogenaza (ADH engl. alcohol dehydrogenase), CYP2E1 (citokrom P450 2E1 oksidaza) i peroksidaza iz hepatocita. Većina etanola metabolizira se preko

alkohol dehidrogenaze u citoplazmi hepatocita. Kao konačni produkti metabolizma etanola u jetri nastaju acetaldehid i acetat. Manji dio metabolizira se na endoplazmatskom retikulu pomoću CYP2E1 mikrosomskih oksidaza ili peroksidazom unutar peroksisoma. Unatoč tome potencijal toksičnosti etanola direktno je vezan uz ove sporedne metaboličke putove preko kojih se također metaboliziraju različiti lijekovi.

## **1.2. Analitičke metode za mjerenje koncentracije etanola u tjelesnim tekućinama**

Koncentracije etanola moguće je precizno i točno određivati iz tjelesnih tekućina pomoću različitih metoda. Najčešće korištene metode određivanja etanola temelje se na principima elektrokemijske detekcije, enzimskih metoda ili plinske kromatografije, dok konkretan izbor metode najviše ovisi o potrebama za koje se određuju koncentracije etanola, kao i o uvjetima u kojima se analiza izvodi (8). Elektrokemijske metode najčešće su korištene u prijenosnim etilometrima koji se primjenjuju u prometu, prvenstveno zbog svoje praktičnosti, iako je njihova pouzdanost slabija u usporedbi s drugim metodama. Za kliničku upotrebu najčešće se primjenjuju enzimske metode koje su dovoljno točne i precizne za pouzdano određivanje, dok su uglavnom prihvatljivije cijenom i jednostavnošću izvođenja od referentne plinske kromatografije. Iz tog se razloga referentna metoda, koja pruža rezultate najbližnje stvarnim vrijednostima, koristi kada je potrebno što točnije odrediti koncentraciju etanola u nekom uzorku, odnosno kada se nastoje procijeniti i usporediti analitički parametri druge metode. U našem istraživanju koristili smo u kliničkoj upotrebi najčešće primjenjivanu enzimsku metodu, kao i referentnu plinsku kromatografiju što nam je omogućilo, osim usporedbe samih metoda, bolju usporedbu rezultata dobivenih iz različitih uzoraka.

### **1.2.1. Vrste uzoraka**

S obzirom na vrlo dobru topljivost etanola u vodi i posljedično široku raspodjelu po organizmu, etanol je moguće detektirati u velikom broju različitih uzoraka. Najčešće se etanol određuje u izdahu, krvi (punoj krvi, serumu i plazmi) i urinu, nešto rjeđe u slini, a ponekad su u primjeni i nestandardni uzorci poput očne vodice, uglavnom u forenzičke svrhe (9,10). Određivanje etanola u izdahu primjenjuje se u kombinaciji sa elektrokemijskim metodama u prijenosnim etilometrima, zbog jednostavnosti i brzine određivanja. Iz količine detektiranog etanola u izdahu, računski se procjenjuje odgovarajuća koncentracija u krvi. Krv je najčešći uzorak u kliničkim određivanjima etanola, prvenstveno zbog najveće pouzdanosti uzorkovanja iz zatvorenog vaskularnog sustava lišenog vanjskih utjecaja i stabilnog volumena te najvišeg stupnja standardizacije, uz relativno jednostavno uzorkovanje. U rutinskoj primjeni uglavnom se koristi plazma ili serum gdje su koncentracije približno jednake. Ukoliko se etanol određuje iz pune krvi, izmjerene koncentracije će biti niže nego u plazmi i serumu, što se pripisuje manjem udjelu vode u punoj krvi (6). Osim toga dio etanola oksidira se u acetaldehid



enzimom iz krvnih stanica, pa se preporuča određivati etanol iz seruma ili plazme nakon odvajanja od stanica (11). Koncentracije etanola u urinu ovise o postignutim koncentracijama u krvi, ali s obzirom na način izlučivanja urina kao i vrijeme zadržavanja u mokraćnom mjehuru, koncentracije u urinu "kasne" za onima u krvi zbog čega nisu pouzdane za njihovu procjenu (9). Ipak, baš zbog vremenskog odmaka u nekim prilikama, kada se mjerenje izvodi u fazi eliminacije, mogu se koristiti za procjenu prethodno postignutih koncentracija u krvi. Osim u spomenutima, moguće je etanol određivati i u drugim uzorcima, npr. elektrokemijskim određivanjem u znoju (12).

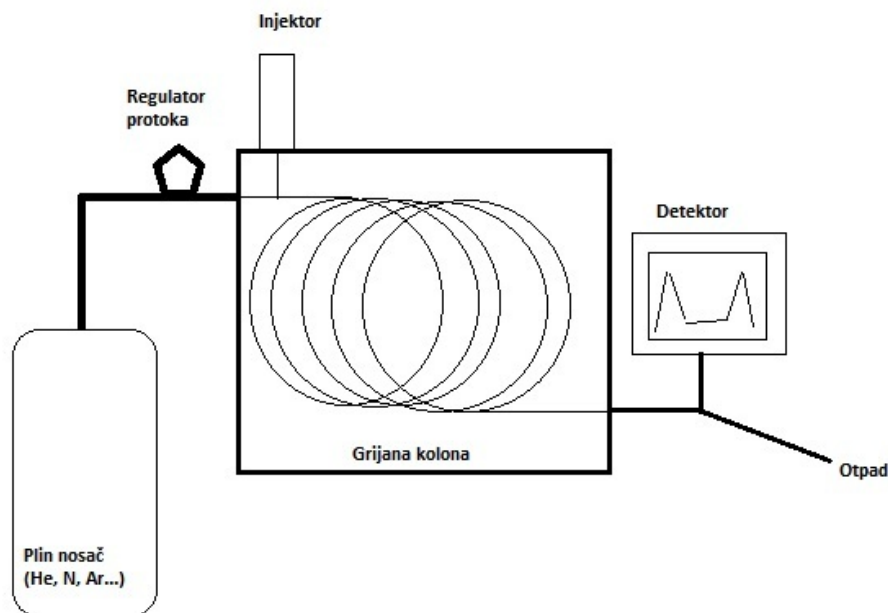
### **1.2.2. Izražavanje koncentracije**

Koncentracije etanola u tjelesnim tekućinama moguće je izražavati u različitim jedinicama. Najčešće se izražava koncentracija u krvi, koja može biti određena prema volumenu ili prema masi krvi. S obzirom da je specifična gustoća krvi veća od 1 g/mL, potrebno je naznačiti izražava li se etanol prema volumenu ili masi krvi, zbog čega je korisnije primjenjivati odgovarajuće jedinice umjesto ponekad korištenih promila (g‰). U Zakonu o sigurnosti prometa na cestama, Republike Hrvatske, koncentracije etanola se izražavaju u jedinicama g/kg (13), dok je uobičajena jedinica izražavanja rezultata analiza dobivenih u medicinsko biokemijskim laboratorijima g/L.

### **1.2.3. Referentna metoda i njezina primjena**

Plinska kromatografija je referentna metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje etanola u tjelesnim tekućinama kao što su krv (serum, plazma), slina ili urin. Visoka specifičnost, točnost i osjetljivost te jednostavna izvedba aparature razlog su širokoj primjeni plinske kromatografije za određivanje velikog broja analita. Osim toga, ne zahtjeva posebnu pripremu uzorka što joj daje dodatnu prednost pred nekim drugim metodama. Najčešća primjena metode je za ispitivanje čistoće supstancija, za odjeljivanje supstancija iz smjesa, u preparativne svrhe, kvalitativnoj i kvantitativnoj kemijskoj analizi u forenzičkim, znanstvenim i toksikološkim ispitivanjima gdje se radi o vrlo niskim koncentracijama analita, a rjeđe se koristi u medicinskoj praksi zbog visoke cijene aparature i duljine vremena analize po pojedinom uzorku što ju čini manje primjerenom za hitnu dijagnostiku ili veliki broj rutinskih analiza.

Plinska kromatografija metoda je izbora za kvantitativno određivanje niskih koncentracija analita s temperaturom vrelišta do 300°C. Za postizanje najboljeg analitičkog rezultata uzorak ne smije sadržavati visoke koncentracije soli, odnosno iona, a prilikom svake analize potrebno je usporediti rezultate s unutarnjim standardom - poznatom supstancom visoke čistoće čije vrijeme zadržavanja na koloni (retencijsko vrijeme) prilikom eluiranja slično retencijskom vremenu analita koji ispitujemo. Shema plinskog kromatografa prikazana je na Slici 2.



**Slika 2. Shema uređaja (kromatografa) za plinsku kromatografiju**

### **1.2.3.1. Načelo metode plinske kromatografije**

Uzorak je injektiran autosemplerom u predkomoru gdje se zagrijava do temperatura nešto viših od temperature vrelišta za analit koji određujemo. U slučaju etanola kojem je vrelište na 78,29 °C, pretkomora se zagrijava na 60 °C. Analit se prevodi u plinoviti oblik i pod tlakom unosi u kolonu u struji inertnog plina (helija, dušika, argona, vodika ili zraka) koji predstavlja mobilnu fazu. Odabir inertnog plina i temperature ovisi o vrsti analita koji određujemo i detektoru na kraju kolone. Različiti analiti koji se nalaze u uzorku mogu se unutar kolone odijeljivati na principu adsorpcije na stacionarnu fazu (polimer na inertnoj čvrstoj fazi) ili se diferencijalno otapa u odgovarajućoj selektivnoj tekućini nanijetoj u tankom sloju na veliku površinu punila kolone (princip razdijeljenja analita između dvije faze). Eluiranje s kolone najčešće je korištena tehnika u plinskoj kromatografiji. Struja plina nosača „eluiraa“ odnosno nosi analite koji različito reagiraju sa stacionarnom fazom, pri čemu dolazi do odjeljivanja različitih analita u uske zone međusobno odijeljenje plinom nosačem. Svaki analit različito reagira sa stacionarnom fazom ovisno o kemijskim i fizikalnim svojstvima same molekule analita. Stoga na detektor analiti dolaze u različitim vremenskim periodima od početka separacije u koloni. Pojedini analit određuje kvalitativno ili kvantitativno u usporedbi sa unutarnjim standardom: susptancom poznatog retencijskog vremena koja se u poznatoj količini dodaje uzorku koji se analizira (14).

Izvedbe detektora su različite i ovise o vrsti uzorka i analita. Neke od češće korištenih su plamenoionizacijski detektor (FID, engl. flame ionization detector) ili detektor termalne provodljivosti (TCD, engl. thermal conductivity detector). FID detektor radi na principu piroliziranja ugljikohidrata u plamenu (sagorijevanje u struji vodika i zraka) pri čemu se stvaraju ioni koji daju električni signal koji se detektira elektrodama. TCD detektor detektira promjenu termalne provodnosti prilikom prolaska analita u struji nosača kroz nit pod električnim naponom načinjenu od volframa i renija. Budući da helij ili dušik imaju veliku termalnu provodljivost, prolaskom kroz volfram-renij nit održavaju nit na nižoj temperaturi, odnosno struja se kroz nit ne mijenja. Kad se u struji helija ili dušika nađe analit eluiran sa kolone, dolazi do promjene termalne provodljivosti i do zagrijavanja niti što dovodi do smanjivanja jakosti struje kroz samu nit, a što se detektira kao signal. Prednost FID-a pred TCD detektorom je u većoj osjetljivosti kod analize ugljikohidrata, ali ne može detektirati vodu te uništava analit. Prednosti TCD detektora su u širem spektru supstanci koje mogu biti analizirane, može detektirati vodu i ne uništava analit pa može biti pred-detektor FID detektoru čime se dobiva veći broj informacija o analitu (15).

Aparatura plinskog kromatografa omogućuje lako rukovanje; *head space* kromatografi (GC-HS, engl. Head Space-Gas Chromatography) omogućavaju trajnost kolone i sprječavaju kontaminaciju injektora (16). GC-HS uključuje termostatiranje zatvorenog uzorka pri čemu iznad tekućine uzorka dolazi do uspostavljanja dinamičke ravnoteže između plinovitog i tekućeg stanja pojedinog analita (17). Analit prelazi u plinovito stanje iznad površine uzorka tijekom inkubacije i odvodi se u kolonu. Slobodni volumen iznad uzorka i vrijeme inkubacije je iznimno bitno jer o njima ovisi konačna količina analita koji će pomoću plina nosača ući u kolonu iz „*head space*“ prostora. GC-HS analiza pogodna je za isparljive spojeve iz tekućih uzoraka, ali i za spojeve nakon nagle termičke desorpcije s čvrstog uzorka (18).

Analiza rezultata najčešće se obavlja u predviđenim programima, analizom dobivenih apsorpcijskih vršaka na kromatogramu. Kvalitativna analiza odgovara usporedbi retencijskih vremenima s vremenom elucije unutarnjeg standarda, a kvantitativna analiza daje informaciju o količini analita u uzorku nakon integriranja površine ispod krivulje u odnosu na površinu ispod krivulje iste supstance u točno poznatoj količini korištene za izradu kalibracijske krivulje (baždarnog dijagrama) (14).

#### **1.2.4. Metode u medicinskoj praksi**

Medicinska praksa ima specifične zahtjeve za metode kojima se iz humanih uzoraka određuju pojedini analiti. Odabir metode ovisi o njenim specifikacijama i učestalosti ispitivanja. Metoda treba zadovoljiti: točnost, preciznost, ponovljivost, reproducibilnost, specifičnost, osjetljivost i područje linearnosti u skladu s fiziološkim koncentracijama i patofiziološkim područjima koja su kompatibilna sa životom. Metoda mora biti prihvatljiva, pristupačna cijenom i mogućnošću da se automatizira,

posebice ako se radi o rutinskim, što znači svakodnevnim ispitivanjima. Svrha određivanja alkohola u medicinskoj praksi najčešće je vezana uz isključivanje alkohola kao uzročnika drugih simptoma ako se radi o akutnim kliničkim slučajevima ili za praćenje pridržavanja apstinencijskog programa kod liječenih alkoholičara (19).

Određivanje alkohola u krvi danas je, nažalost, jedna od češćih pretraga u medicinskoj praksi, koja se obavlja na dnevnoj bazi. Kao uzorak koristi se najčešće venska krv, a u manjoj mjeri urin.

Enzimski metoda s ADH metoda je izbora u zdravstvenim ustanovama zbog svoje pristupačne cijene i aparature za mjerenje. Zahtjevi metode moraju biti jasno postavljeni kako bi rezultat dobiven tom metodom mogao što vjerodostojnije prikazati stvarno kliničko stanje. Zbog individualnih razlika u metabolizmu etanola i indukcije enzima za razgradnju, koncentracija ne mora nužno korelirati sa kliničkom slikom. Upravo iz tog razloga važno je pokriti šire područje koncentracija etanola s naglaskom na više koncentracije budući da one predstavljaju veći rizik za pacijenta koji je u akutnom stanju, u hitnom prijemu i čija se diferencijalna dijagnostika tek postavlja. Niže koncentracije, posebice one na granici detekcije, imaju manju kliničku važnost budući da etanol u nižim koncentracijama ima blaži učinak na organizam ili potpunosti izostaje kod pojedinaca. Ali, i te niže koncentracije nisu nevažne u praćenju pacijenata na liječenju od kroničnog alkoholizma.

### **1.3. Društvena, medicinska i pravna gledišta na učinak alkohola**

#### **1.3.1. Društveno i kulturološko poimanje pijenja alkohola**

Etanol, kolovijalno poznat kao alkohol, ima ključnu ulogu u gotovo svim civilizacijama i zajednicama još od oko 4000 god. pr. Kr. gdje pije alkoholnih pića predstavlja društvenu aktivnost, a sama konzumacija i obrasci ponašanja povezani s njegovom konzumacijom pod velikim su utjecajem pojedine kulture. Postoje značajne razlike u društvenom poimanju alkohola i njegove konzumacije gdje se u nekim društvima (UK, Skandinavija, SAD, Australija) više povezuje sa nasilnim i antisocijalnim ponašanjem, dok se u drugima (Mediterran i neke Južno Američke kulture) konzumacija alkohola poima kao mirna i društvena.

Kulturološkim istraživanjima i eksperimentima utvrđeno je da utjecaj alkohola na ponašanje pojedinca više ovisi o društvenim i kulturološkim faktorima nego samim fiziološkim efektima etanola na organizam. Alkoholna pića nose snažnu simboličku ulogu koja može biti korištena u različite svrhe, npr. obilježavanje prirode određenog društvenog događaja ili situacije, pokazatelj društvenog statusa, izražavanje pripadnosti određenoj skupini itd. Konzumacija alkohola često se povezuje i sa negativnim utjecajima na društvo i pojedinca. Na globalnoj razini, fizički, psihički i sociološki problemi povezani sa alkoholom odnose se na manji dio (manje od 10%) populacije koja konzumira alkohol. Većina problema koji se povezuju sa alkoholom (nasilje, kriminal, nesreće, bolesti) nastaju kao posljedica prekomjernog konzumiranja, češće nego umjerene konzumacije. Iako su u nekim kulturama problemi

povezani s alkoholom češći, u većini kultura je umjereno konzumiranje norma, dok je prekomjerna konzumacija kao i potpuna apstinencija prisutna tek kod manjeg dijela populacije (20).

U modernom društvu, gdje se dogodila sveopća eksplozija primjene strojeva i automatizacije, pijenje alkohola u tzv. umjerenim količinama suočava se s neproporcionalno velikom opasnošću za sigurnost ljudi na radu i u prometu. Jednaka nesigurnost prijete onima koji piju, kao i onima koji se nalaze u njihovoj blizini. Stoga je pijenje alkohola dobilo višedimenzionalnu i višestruku društvenu opasnost.

### **1.3.2. Medicinsko stajalište - organski i psihički poremećaji**

Alkohol se u raznim civilizacijama konzumira od pamtivijeka, pa su njegovi učinci na organizam vrlo dobro poznati. Koncentracija etanola u krvi ne mora nužno korelirati sa objektivnim pokazateljima „opijenosti“, posebice kod kroničnih alkoholičara kod kojih su zabilježene rekordno visoke koncentracije etanola uz tek neke od znakova opijenosti. Najčešće akutne promjene koje se mogu zapaziti kod osoba koje konzumiraju alkohol prikazane su tablicom (Tablica 1). Uočavamo psihičke i motoričke poremećaje u širokom spektru: od posve bezazlene euforije do kome i zastoja disanja. Međutim, mozak nije jedina meta etanola; štetni učinci (posebice kod dugoročnog konzumiranja većih količina alkoholnih pića) očituju se kao disbalans endokrinih funkcija, anemija, oštećenje sluznica gastrointestinalnog trakta, alkoholna neuropatija, alkoholna bolest jetre i kao mnogi drugi višeorganski poremećaji.

### Tablica 1. Stupnjevi utjecaja akutne alkoholiziranosti

(preuzeto od: Dubowski KM, Gadsden Rh Sr, Poklis A. The stability of ethanol in human whole blood controls: an interlaboratory evaluation. J Anal Toxicol. 1997 Oct; 21(6):486-91)

Koncentracije etanola u krvi (izražene u g/L)	Utjecaj	Ponašanje i motorički poremećaji
0,1 – 0,5	Subklinički	Normalno ponašanje, bez utjecaja alkohola Nepravilnosti primjećene specijalnim testovima
0,3 – 1,2	Euforija	Srednje jaka euforija, druželjubivost, pričljivost Povišeno samopouzdanje, smanjena inhbicija Smanjenje sensoromotoričkih funkcija Manjak pažnje, sposobnosti procjene i samokontrole Usporena obrada informacija Smanjena mogućnost percepcije i pamćenja Gubitak efikasnosti kod izvođenja finih radnji
0,9 – 2,5	Uzbuđenje	Emotivna nestabilnost; gubitak kritične procjene Produljeno vrijeme reagiranja i snižen senzorni odgovor Mamurluk, pospanost Smanjena oštrina vida Sensoromotorna nekoordiniranost, poremećena ravnoteža
1,8 – 3,0	Konfuznost	Dezorijentiranost, zbunjenost, vrtoglavica, mučnina Preterani emotivni ispadi (bijes, strah, tuga) Poremećaji vida Povećan prag za bol Poremećaj mišićne koordinacije Apatija, letargija
2,5 – 4,0	Tupost	Generalna inercija; gubitak motornih funkcija Značajno smanjen odgovor na stimulans Značajna nekoordinacija mišića – nemogućnost stajanja ili hodanja Povraćanje, nemogućnost zadržavanja urina ili fecesa Smanjeno stanje svijesti; pospanost ili tupost
3,5 – 5,0	Koma	Potpuna neprisebnost, koma Sniženi ili posve odsutni refleksi Snižena tjelesna temperatura (pothlađenost) Disfunkcija cirkulacijskog i respiracijskog sustava
<4,5	Smrt	Smrt zbog zastoja respiracije

Etanol se često konzumira i kao energetski stimulans jer je dobar izvor kalorija. Neishranjenost koju prate manjak folne kiseline, tiamina i ostalih vitamina dovodi do dodatnih komplikacija metabolizma,

smanjene apsorpcije hranjivih tvari i do insuficijencije pankreasa. Alkoholna bolest jetre obuhvaća disfunkciju jetre uzrokovanu dugotrajnom konzumacijom etanola. Manifestira se kao alkoholni hepatitis, ciroza jetre (oštećeno tkivo jetre prelazi u fibrozno, disfunkcionalno tkivo) ili masna jetra (karakterizirana prekomjernim odlaganjem masti u jetri). Apstiniranjem od alkohola neka od navedenih stanja su reverzibilna (19).

### **1.3.3.Pravni okviri – prekršaji u prometu i na radnom mjestu**

Poznato je da etanol može značajno narušiti koordinaciju, vid, reflekse te sposobnost ispravnog rasuđivanja što može dovesti do ozljeda, prometnih nesreća, nastanka materijalne i druge štete, pogotovo za vrijeme obavljanja zahtjevnijih radnji. Iz tog razloga uvedene su različite zakonske regulative koje zabranjuju konzumaciju etanola ili ograničavaju dozvoljene koncentracije u određenim okolnostima, prvenstveno u prometu i na radnom mjestu. Prema Zakonu o sigurnosti prometa na cestama Republike Hrvatske definirane su dozvoljene koncentracije etanola u krvi u pojedinim okolnostima. Vozačima kategorije vozila C, D i H, instruktorima vožnje i mladim vozačima kao i vozačima kategorije B (osobni automobili) koji upravljaju vozilom u profesionalne svrhe nije dozvoljeno imati koncentracije etanola u krvi veće od 0,00 g/kg. Vozačima kategorije vozila A, B, F, G i AM dozvoljeno je imati koncentracije etanola u krvi do 0,50 g/kg, (13). Također, Zakonom o zaštiti na radu, Republike Hrvatske propisano je kako radnik prilikom obavljanja posla ne smije u krvi imati etanola u koncentraciji većoj od 0,0 g/kg, odnosno više od 0,0 miligrama u litri izdahnutog zraka.(21)

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Sveprisutnost etanola u svakodnevnom životu dovodi u pitanje sigurnost konzumiranja alkoholnih pića prvenstveno prilikom upravljanja strojevima i osobnim vozilima. Cilj je ovog rada u skupini ispitanika oba spola izmjeriti koncentraciju etanola u slini, krvi i urinu nakon konzumacije društveno prihvatljive količine alkoholnih pića te zabilježiti subjektivne i objektivne promjene koje će ispitanici pokazati. Uzorci će se uzimati u fazi apsorpcije i eliminacije i mjeriti enzimatskom metodom kakvu koriste medicinski laboratoriji te referentnom kromatografskom metodom. Rezultatima testiranja želimo pokazati da društveno prihvatljive količine alkoholnih pića nisu prihvatljive u radu i prometu iako ne prelaze zakonski dozvoljene koncentracije. Zbog nepredvidive interindividualne varijabilnosti utjecaja alkohola i pouzdano mjerljive količine alkohola u području  $<0,5$  g/L može imati ozbiljnih društvenih i sudskih prijevora.

### Specifični ciljevi

1. Pilot studijom ispitati sadržaj etanola u slini ispitanika 30, 60, 90 i 120 min nakon konzumacije 5 čokoladnih pralina punjenih alkoholom.
2. Uzorkovati slinu, urin i krv ispitanika 20 min nakon konzumacije alkoholnog pića kad se očekuje apsorpcijski maksimum te nakon 90 min kad je eliminacija u tijeku.
3. Izmjeriti koncentraciju etanola u slini, urinu i serumu pomoću enzimske metode i referentne metode (plinske kromatografije).
4. Usporediti rezultate dobivene s dvije analitičke metode.
5. Usporediti sadržaj etanola u slini i krvi.
6. Ocijeniti eliminaciju etanola na temelju nalaza u urinu.
7. Ispitati subjektivni i objektivni utjecaj etanola na ispitanika nakon 20 i 90 minuta od uzimanja alkoholnog pića i povezati ih s koncentracijama u uzorcima.
8. Usporediti farmakokinetiku etanola u odnosu na spol i na tjelesnu masu.
9. Ocijeniti pouzdanost enzimske metode u usporedbi s referentnom plinskom kromatografijom.
10. Zaključiti koliko je konzumacija društveno i zakonski prihvatljivih količina alkohola uistinu bezazlena za sudjelovanje u prometu ili za odgovorne radne aktivnosti.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kratka pilot studija s čokoladnim pralinama**

Za procjenu koncentracija etanola u slini nakon konzumacije vrlo malih količina etanola, provedena je kratka studija na dva ispitanika različitih spolova. Etanol je konzumiran u obliku čokoladnih pralina s alkoholnim punjenjem, nakon čega su određivane koncentracije etanola u slini. U jutarnjim satima između 9 i 10 h, u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu ispitanici koji su bili natašte konzumirali su u razmacima od par minuta 5 čokoladnih pralina s alkoholnim sadržajem dostupnih u slobodnoj prodaji. Odluka o 5 komada pralina temeljila se na procjeni realnih okolnosti u kojima nije očekivana veća konzumacija čokoladnih pralina. Prosječna masa svake praline bila je 12,75 g, ukupnog sadržaja etanola od 4% (na ovaj način unešeno je 2,55 g etanola po ispitaniku). Nakon konzumacije započeto je mjerenje vremena, te su nakon zadanih vremenskih intervala (30, 60, 90, 120 min), ispitanicima uzeti uzorci sline. Sadržaj etanola u uzorkovanoj slini određen je pomoću rutinske enzimske metode s ADH odmah po uzorkovanju te pomoću referentne metode - plinske kromatografije nakon jednog dana. Uzorci su bili hermetički zatvoreni i pohranjeni u hladnjaku na 5,5°C. Detalji o metodama, uređajima i mjestu analize opisani su u poglavlju 3.2.

##### **3.1.2. Ispitanici**

U ispitivanje je bilo uključeno 10 zdravih dobrovoljaca, studenata Sveučilišta u Zagrebu. Skupina ispitanika bila je ujednačena po spolu, sastavljena od 5 mladića i 5 djevojaka u dobi između 22 i 30 godina. Kriteriji uključivanja u ispitivanje podrazumijevali su odsustvo znakova i simptoma bilo kakvih kroničnih ili akutnih bolesti, organske ili mentalne naravi. Jedinu osobni podaci uzeti od ispitanika bili su spol, dob i tjelesna masa. Spremnici (epruvete za krv i slinu, kao i posude za urin) bili su prethodno obilježeni rednim brojem ispitanika i vremenom nakon konzumacije alkoholnog pića (20 ili 90 min.) kada će uzorci biti uzeti. Etička povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te KBC Sestre milosrdnice odobrila su istraživanje.

##### **3.1.3. Konzumacija alkohola i dinamika uzorkovanja**

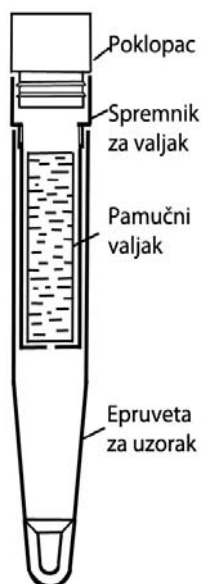
U prijednevnom satima između 10 i 11 sati, nakon uobičajenog doručka oko 9 sati ispitanici su konzumirali 0,5 dL alkoholnog pića s udjelom alkohola od 40% unutar 5 minuta, nakon čega je započeto mjerenje vremena. Ispitanici su konzumirali alkoholno piće s međusobnim kratkim vremenskim odmakom kako bi bilo osigurano vrijeme potrebno za uzimanje uzoraka. Na taj način omogućeno je uzorkovanje u jednakim vremenskim intervalima za sve ispitanike. Nakon 20 i 90

minuta od konzumacije ispitanicima su uzeti uzorci sline, urina i krvi standardnim postupcima medicinskog laboratorija.

### 3.1.4. Uzorkovanje krvi

Uzorke krvi uzimali su educirani i ovlašteni zdravstveni radnici u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice na lokaciji Klinike za traumatologiju u Zagrebu. Krv je uzimana u standardne epruvete s podtlakom od 3 mL bez dodatka antikoagulansa (Vacuette, Greiner-Bio one, Austrija). Za obje točke mjerenja, svakom ispitaniku je uzeta po jedna epruveta krvi. Nakon uzorkovanja, uzorci su centrifugirani 10 min relativnom centrifugalnom snagom od  $1800\times g$  (Rotofix 32 A, Hettich, Njemačka) kako bi se izdvojio serum iz kojeg je vršena analiza.

### 3.1.5. Uzorkovanje sline



**Slika 3. Epruveta za uzorkovanje sline**

Slina je uzorkovana standardiziranim i jednostavnim rutinskim postupkom, korištenjem dvostrukih sterilnih epruveta sa pamučnim jastučićem, pod imenom Salivette tvrtke Startstat (Njemačka). Prije uzorkovanja sline potrebno je najmanje 15 minuta ne uzimati nikakva jela ni pića i ne pušiti. Sterilni pamučni jastučić valjati u ustima jednu minutu, nakon čega se ispljune bez dodirivanja u unutarnju epruvetu te centrifugira 2 minute u centrifugi (Rotofix 32 A, Hettich, Njemačka) relativnom centrifugalnom snagom od  $1000\times g$ . Centrifugiranjem se uzorak nađe na dnu vanjske epruvete, nakon čega se izvadi unutarnja epruveta, i vanjska epruveta hermetički zatvori odgovarajućim čepom. Uzorak sline na takav je način siguran od hlapljenja. Nakon centrifugiranja uzorak se analizirao enzimskom metodom, a do trenutka analize GC-HS-FID metodom dva dana kasnije čuvan je u hladnjaku na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.6. Uzorkovanje urina

Uzorci urina dobiveni su standardnim postupkom medicinskog laboratorija, uriniranjem u plastičnu posudu predviđenu za uzorak urina. Svakom ispitaniku osigurana je privatnost odlaskom u zasebnu prostoriju toaleta. Uzorak uzet na ovaj način odmah je spreman za analizu. Urin je prelišen u plastične epruvete, hermetički zatvoren i pospremljen u hladnjak na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  do trenutka analize.

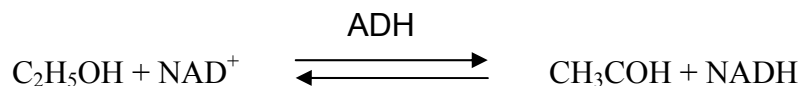
### 3.1.7. Stabilnost uzoraka

Temeljem validacije koja je provedena u Kliničkog zavoda za kemiju (22) te u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" (RU-144/2-26), a koji su akreditirani po međunarodnoj normi ISO 15189, držali smo pouzdanim podatak da je uzorak za određivanje alkohola stabilan 3 dana ako je hermetički zatvoren i arhiviran u hladnjaku na +4 °C (23). Dobro začepljeni uzorci s etanolom stabilni su tijekom perioda do 3 h od uzorkovanja, na sobnoj temperaturi (24). Otčepljeni uzorci nisu stabilni nakon 2 h od uzorkovanja.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Enzimatska metoda

Određivanje etanola iz sline, seruma i urina izvedeno je na biokemijskom analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens, Njemačka). Analizator je prethodno kalibriran Siemens Dimension CHEM III CAL (LOT 5ED009 ) kalibratorima, (Siemens, Njemačka) nakon čega je kvaliteta metode ispitana s dva kontrolna uzorka za normalnu razinu (ciljna vrijednost 0,5 g /L), odnosno za visoku razinu (ciljna vrijednost 1,5 g/L) za kontrolu kvalitete. Obje su kontrole zadovoljavale kriterije: rezultat normalne razine bio je 0,52 g/L etanola (kriterij prihvatljivosti 0,4-0,6 g/L), odnosno 1,48 g/L (prihvatljivo 1,2-1,8g/L) za visoku razinu. Korištene kontrole su Ammonia/ Ethanol / CO<sub>2</sub> Control ROCHE Cobas (Roche, Švicarska). Princip metode određivanja etanola temelji se na visokoj specifičnosti enzima ADH prema molekuli etanola i NAD<sup>+</sup> (nikotinamid adenin dinukleotida) kao kofaktora enzima. Oksidacijom etanola uz NAD<sup>+</sup> nastaje acetaldehid i NADH, a reakcija se prati spektrofotometrijski porastom apsorbanije reakcijske smjese pri valnoj duljini od 340 (tzv. optički test).



Mjerno područje definirano je od 0,03- 3,00 g/L etanola (0,7 – 65,1 mmol/L). Uzorke čiji rezultati prelaze gornju granicu mjernog područja treba razrijediti i ponoviti mjerenje. Iz razrjeđenja i rezultata dobivenog u razrijeđenom uzorku računski se dobije stvarna vrijednost u primarnom uzorku. Limit detekcije predstavlja najnižu koncentraciju koju analizator može sa 95% pouzdanošću odrediti u uzorku. Svaki rezultat ispod te vrijednosti izražava se kao „manji od“ vrijednosti limita detekcije. Zbog uporabe enzima specifičnog za etanol, ova je reakcija vrlo malo podložna interferencijama. Neke od tvari koje mogu interferirati su n-propanol ili n-butanol.

### 3.2.2. Plinska kromatografija (GC-HS-FID) – referentna metoda

Određivanje etanola iz sline, seruma i urina izvršeno je plinskim kromatografom (GC-HS-FID, engl. Head Space-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector) marke Clarus 500s i Clarus 600s proizvođača Perkin Elmer (SAD) s TurboMatrix 40 headspace samplerom, u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ u Zagrebu. Za detekciju smo koristili plamenoionizacijski detektor (FID) koji za pirolizu analita koristi smjesu vodika i zraka. Kao plin nosač ovaj kromatograf koristi dušik visoke čistoće. Procesom rada samog analizatora upravlja računalni program TotalChrom (Perkin Elmer, SAD), a rezultati se prikazuju u obliku kromatograma koji prikazuju mjerne signale detektora analognim krivuljama s vršcima u različitim retencijskim vremenima. Specifikacije opreme navedene su u Tablici 2.

**Tablica 2. Specifikacije opreme plinskog kromatografa Clarus (Perkin Elmer, SAD)**

	Naziv opreme /proizvođač
1.	Gas Chromatograph Clarus 500 s Headspace Sampler TurboMatrix 40 Perkin Elmer, SAD
2.	Gas Chromatograph Clarus600 s Headspace Sampler TurboMatrix 40 (Clarus L) Perkin Elmer, SAD
3.	Gas Chromatograph Clarus600 s Headspace Sampler TurboMatrix 40 (Clarus D) Perkin Elmer, SAD
4.	kapilarne kolone (BAC1-30m x 0,32mm x 1,80µm i BAC2-30m x 0,32mm x 1,20µm )
5.	Pure Gas Hydrogen Generator (PG – H <sub>2</sub> , 500)
6.	boca s dušikom 5.0; (N <sub>2</sub> ≥ 99,999 vol. %), Messer Griesheim
7.	boca sa sintetskim zrakom;(20,5 O <sub>2</sub> u N <sub>2</sub> ) Messer Griesheim

Priprema uzorka uključuje centrifugiranje pune krvi i dobivanje seruma, kao i pripremu unutarnjeg standarda i izradu kalibratorske krivulje (baždarnog dijagrama). Za interni standard koriste se otopine n-propanola (375µL/1000mL destilirane vode) i terc-butanola (0,06mL /1000 mL destilirane vode). Za izradu kalibracijske krivulje koriste se standardne otopine etanola od 0,3– 4,0 g/L (Medidrug Ethanol, Njemačka). Na početak i kraj svake serije postavljaju se standardi jednakih koncentracija etanola iz kojih se izračunava baždarni faktor potreban za izračunavanje koncentracije etanola u uzorcima. Na pretposljednje mjesto u seriji postavlja se tzv. X standard poznate koncentracije etanola koji služi za kontrolu točnosti rezultata analiza. Pomoću računalnog programa TotalChrom iz površine pod vrškom električnog signala nastalog izgaranjem u plamenu standardne otopine etanola poznate koncentracije koja se analiza na početku i kraju serije uzoraka izračunavaju se baždarni faktori RF1 i RF2. Pomoću njih izračunavaju se nepoznate koncentracije etanola u drugim uzorcima. Standard X služi za

provjeravanje točnosti rezultata unutar serije mjerenja, ako njegova vrijednost odstupa za više od  $\pm 4\%$ , za izračun nepoznatih koncentracija ne koristi se srednja vrijednost baždarnih faktora već samo onaj faktor koji daje točniji rezultat za standard X. Uvjeti kromatografiranja za korišteni GC-HS-FID kromatograf prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3. Uvjeti analize na Clarus 500 s i Clarus 600 s plinskim kromatografima (GC-HS-FID)**

Uvjeti analize na Clarus 500 s i Clarus 600 s plinskim kromatografima	
Kapilarne kolone:	BAC-1-30m x 0,32mm x 1,80 $\mu$ m i BAC-2-30m x 0,32mm x 1,20 $\mu$ m
Tlak dušika:	30 psi (približno 207 kPa)
Vrijeme termostatiranja uzoraka:	12 min
Temperatura zagrijavanja uzoraka:	60°C
Vrijeme presurizacije:	1 min
Vrijeme injektiranja:	0,02 min (0,04 min. za analizu s terc-butanolom)
Vrijeme ispuhivanja:	0,2 min
Temperatura igle:	70°C
Temperatura transfer linije:	75°C
Vrijeme analize:	3,8 min

### **3.2.3. Metode procjene utjecaja etanola na ispitanike**

Motoričke funkcije koje su blago promijenjene kod konzumacije alkohola mogu biti jedan od objektivnih pokazatelja utjecaja alkohola, koji uz subjektivan osjećaj može upotpuniti informaciju o primjećenom djelovanju alkohola pri nižim koncentracijama. Premda se koncentracije etanola u tjelesnim tekućinama razlikuju, poneki se obrasci ponašanja mogu prepisati većini ispitanika nakon konzumacije „društveno prihvatljive količine“ alkohola. Ispitanici najčešće spominju osjećaj topline, blage euforije, vrtoglavice ili osjećaj da ne mogu „razbistriti“ misli.

Ispitivani su objektivni i subjektivni pokazatelji utjecaja etanola modificiranim i pojednostavljenim načinom kakav se nađe u relevantnoj stručnoj literaturi (25).

#### **Subjektivni pokazatelji**

- osjećaj pijanstva, smušenih misli, smanjene koncentracije; iskazano samoprocjenom ispitanika u kategorijskim varijablama +, ± ili -.

#### **Objektivni pokazatelji**

- Pozicijski nistagmus - procijenjen kao nevoljna kretnja oka (odlikuje se izmjeničnim glatkim pokretima oka u jednom smjeru i brzim pokretima oka u drugom smjeru) u praćenju predmeta koji se pomiče ispred oka od nosa na krajnju lijevu pa na desnu stranu dosega pogleda; detektiranje nemogućnost smirenja oka u krajnjoj točki pogleda predmeta izraženo u kategorijskim varijablama +, ± ili -.
- Tremor ispruženih ruku – opažanje drhtanja vodoravno ispruženih ruku s ispruženim dlanovima; izraženo u kategorijskim varijablama +, ± ili -.
- Hodanje po pravcu dužine 5 m otvorenih očiju – zapažanje nemogućnosti da se zadrži pravocrtno hodanje izraženo u kategorijskim varijablama +, ± ili -.

Ispitanici su testirani na navedene pokazatelje 20 i 90 min od uzimanja alkohola, odnosno neposredno prije prvog i drugog uzorkovanja. Rezultati su prikazani u Tablici 7. u rezultatima.

### **3.2.4. Statistička metoda**

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 12.2.1.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Metodom deskriptivne analize prikazane su karakteristike skupova podataka, Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom ispitana je normalnost raspodjele. MedCalc, softverski program dizajniran je za istraživanja na području biomedicine i omogućava lako rukovanje i vrlo pouzdane proračune. Pomoću

ovog programa izradili smo opću statističku tablicu, prikazali odnose među pojedinim parametrima korelacijskom i regresijskom analizom, koristili statističke testove za provjeravanje normalnosti raspodjele parametara, ili pojedine analize (Bland Altman) za usporedbu metoda. Program je pristupačan studentima i znanstvenicima s detaljno razješnjenim uputama za uporabu, kao i teorijskom pozadinom svakog statističkog testa.

Ovisno o distribuciji podataka korišteni su neparametrijski ili neparametrijski testovi i u skladu s tim podatci su prikazani medijanom i rasponom izmjerenih vrijednosti ili pak srednom vrijednošću i standardnom devijacijom. Za ispitivanje povezanosti varijabli korišten je statistički postupak po Spearmanu za neparametrijske testove s pripadajućim koeficijentom korelacije i njegovom statističkom značajnošću P. Koeficijenti korelacije tumačili smo prema Coltonu (Tablica 4.). Modelom linearne regresije procjenjivali smo ovisnu varijablu prema predikcijskoj na razini statističke značajnosti  $P < 0,05$ . Usporedba metoda analizirana je Bland-Altmanovim modelom. Za usporedbu varijabli korišten je neparametrijski Mann-Whitney (neovisni uzorci) i Wilcoxonov test (parni uzorci). Svi rezultati interpretirat će se na razini statističke značajnosti  $P < 0,05$ .

**Tablica 4. Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu**

Koeficijent korelacije	Povezanost
0 do $\pm 0,25$	Nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	Slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	Umjereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do $\pm 1$	Dobra do izvrsna povezanost

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kratki pilot pokus s čokoladnim pralinama

Količina etanola u 5 pralina koje su konzumirali ispitanici iznosila je 2,55 g, a prema tjelesnoj masi uzeli su 0,03 g alkohola/kg i 0,051 g alkohola/kg tjelesne mase. Izmjerene količine alkohola u slini u vremenskim razmacima od 30 min pokazale su vrijednosti od 0,00 do 0,02 g/L. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5. Rezultati mjerenja alkohola u slini nakon unosa 2,55 g etanola konzumiranjem 5 čokoladnih pralina**

Vrijeme (min):	Etanol u slini (enzimska metoda, g/L)		Etanol u slini (kromatografska metoda, g/L)	
	Muški ispitanik	Ženski ispitanik	Muški ispitanik	Ženski ispitanik
30	0,01	0,02	0,00	0,00
60	0,01	0,01	0,00	0,00
90	0,01	0,01	0,00	0,00
120	0,01	0,01	0,00	0,00

### 4.2. Pokus sa pijenjem alkoholnog pića

#### Opisna statistika ispitanika i mjerenja etanola

U studiji je sudjelovalo deset ispitanika jednakih udjela spolova s dobnim medijanom od 23 godine. Prosječna tjelesna masa ispitanika bila je 66,9 kg u rasponu od 50 do 87 kg. Unutar 3 min popili su 0,5 dL žestokog pića deklariranog s 40% sadržaja etanola te tako po kilogramu mase unijeli prosječno 0,242 g etanola/kg tjelesne mase (od 0,181 do 0,316). Nakon 20 i 90 min uzeti su uzorci krvi kojima je odvojen serum (oznaka), sline (Oznaka) i urina (oznaka) te im je određena koncentracija etanola enzimskom metodom (Oznake redom) i metodom plinske kromatografije (oznake redom). Koncentracije etanola u svih ispitanika bile su manje od 5 g/L kako je bilo predvidljivo. No, zapažene su značajne interindividualne razlike u svim vrstama uzoraka neovisno o mjerne metodi. U Tablici 6. prikazana je deskriptivna statistika ispitivane skupine.



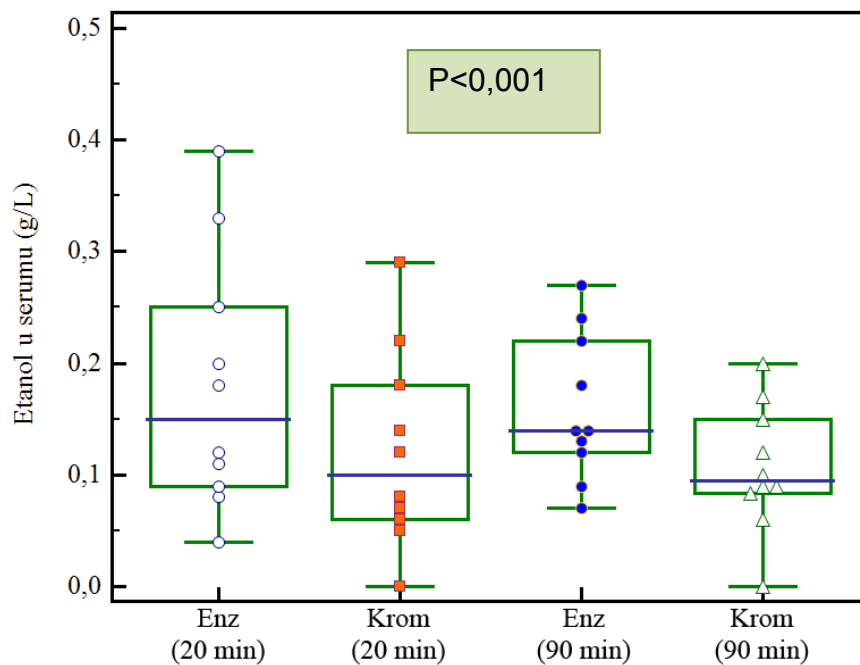
**Tablica 6. Opisna statistika istraživanog skupa i rezultata mjerenja koncentracije etanola nakon konzumiranja 50 mL alkoholnog pića s 40% udjelom etanola**

	N	m±SD	95% CI	M	95% CI	Min	Max	25 - 75 P	P
Dob (god)	10	23,1± 2,03	21,652- 24,55	23,0	21,5- 24,0	21	28	22-24	0,0072
Tjelesna masa (kg)	10	66,900	59,222 - 74,578	69,50	56,275 - 72,525	50,00	87,00	61,000 - 72,000	0,8316 *
g uzetog etanola/kg TM	10	0,242	0,212 - 0,271	0,227	0,217 - 0,282	0,181	0,316	0,219 - 0,259	0,4796 *
Serum-20 (enz)	10	0,179	0,0971 - 0,261	0,150	0,0847 - 0,292	0,040	0,390	0,0900 - 0,250	0,5152 *
Serum-90 (enz)	10	0,160	0,113 - 0,207	0,140	0,104 - 0,231	0,070	0,270	0,120 - 0,220	0,6631 *
Urin-20 (enz)	10	0,0740	0,0308 - 0,117	0,050	0,0300 - 0,111	0,030	0,220	0,0300 - 0,090	0,0042
Urin-90 (enz)	10	0,233	0,150 - 0,316	0,210	0,125 - 0,357	0,110	0,420	0,130 - 0,310	0,4251 *
Slina-20 (enz)	10	0,192	0,105 - 0,279	0,150	0,0947 - 0,298	0,070	0,440	0,100 - 0,240	0,2218 *
Slina-90 (enz)	10	0,163	0,114 - 0,212	0,145	0,109 - 0,241	0,060	0,270	0,130 - 0,230	0,7994 *
Serum-20 (krom)	10	0,121	0,0580 - 0,184	0,100	0,0547 - 0,201	0,000	0,290	0,0600 - 0,180	0,5722 *
Serum-90 (krom)	10	0,106	0,0655 - 0,147	0,095 0	0,0714 - 0,161	0,000	0,200	0,0840 - 0,150	0,8833 *
Urin-20 (krom)	10	0,0270	-0,0165 - 0,0705	0,000	0,000 - 0,0473	0,000	0,180	0,000 - 0,000	0,0004
Urin-90 (krom)	10	0,184	0,103 - 0,265	0,145	0,0800 - 0,317	0,080	0,360	0,0800 - 0,270	0,3808 *
Slina-20 (krom)	10	0,166	0,0781 - 0,254	0,130	0,0847 - 0,273	0,000	0,410	0,0900 - 0,220	0,3526 *
Slina-90 (krom)	10	0,136	0,0848 - 0,187	0,130	0,0890 - 0,211	0,000	0,240	0,110 - 0,200	0,8331 *

N - broj ispitanika; m - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija; 95% CI – 95% interval pouzdanosti; M – medijan; Min – najniža izmjerena vrijednost; Max – najviša izmjerena vrijednost; 25 - 75 P - raspon veličina varijabli od 25 - 75 percentile; P – normalnost distribucije; (Gaussovoj razdiobi pripada  $P>0,05$ ) TM – tjelesna masa; \* - normalna distribucija; 20 i 90 – oznake za mjerenja 20 i 90 min nakon konzumacije; krom – kromatografska metoda; enz – enzimski metoda

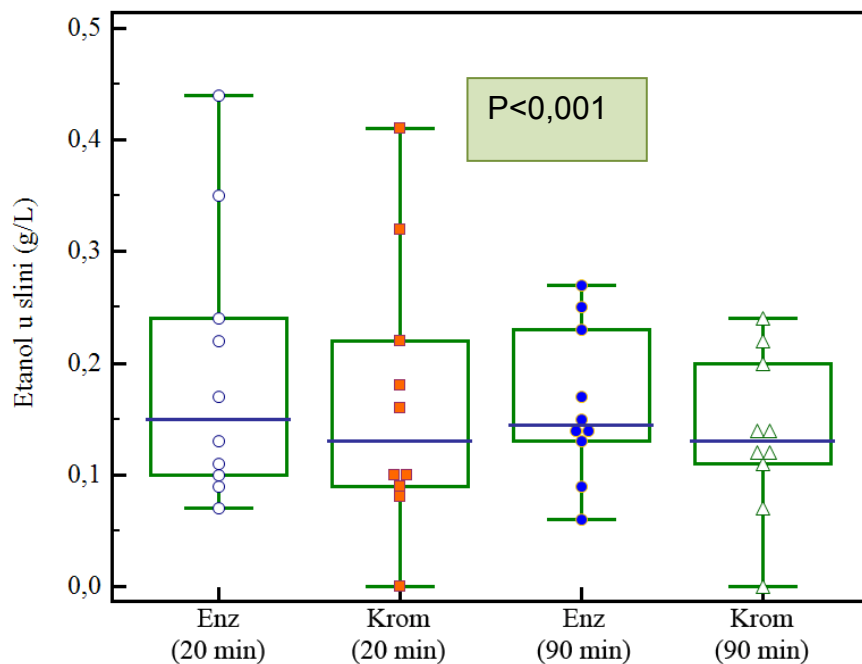
Grafički prikazi (Slike 3.- 5.) jasnije prikazuju rezultate mjerenja, osobito u sagledavanju razlika među metodama. Centralni kvadrat obuhvaća vrijednosti od 25 do 75 percentile (interkvartilni raspon), središnja linija u kvadratu predstavlja medijan, horizontalne kratke linije protežu se od minimuma do maksimuma isključujući ona ekstremna mjerenja koja se izdvajaju iz skupine (1,5 ili 3 puta veći/manji od gornje/donje kvartile)

U rezultatima se uočavaju niže koncentracije etanola pri određivanju etanola u svim uzorcima mjerenim mjerenim metodom plinske kromatografije. Trend se ponavlja i prilikom određivanja nakon 20 i nakon 90 minuta od uzimanja alkohola, a Wilcoxonov parni test pokazuje statistički značajnu razliku, odnosno medijani se kreću oko 0,15 promila za enzimsku metodu, odnosno oko 0,1 promil za GC metodu.

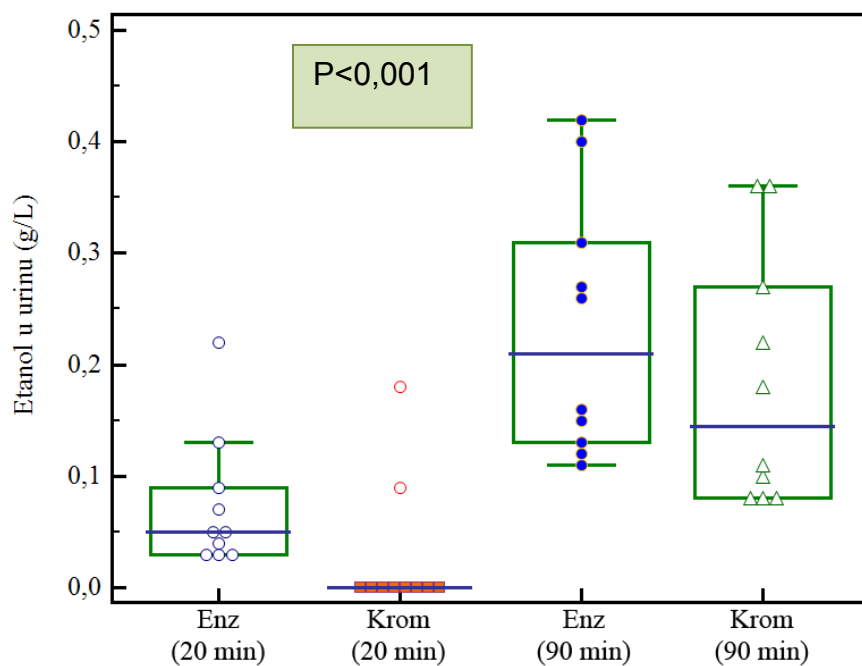


**Slika 3. Prikaz koncentracija etanola u serumu 10 ispitanika 20 i 90 minuta nakon konzumacije 0,5 dL alkoholnog pića s 40% etanola**

Koncentracije etanola izmjerene su enzimskom metodom (Enz) i metodom plinske kromatografije (Krom)



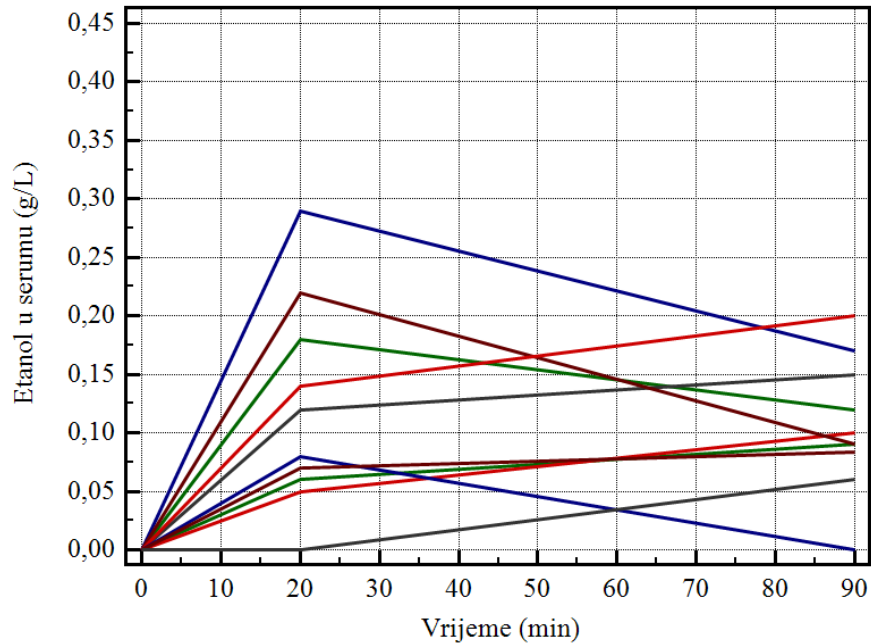
**Slika 4. Prikaz raspodjele koncentracija etanola odredivanog u slini 10 ispitanika nakon 20 i 90 minuta, enzimskom (Enz) i metodom plinske kromatografije (Krom)**



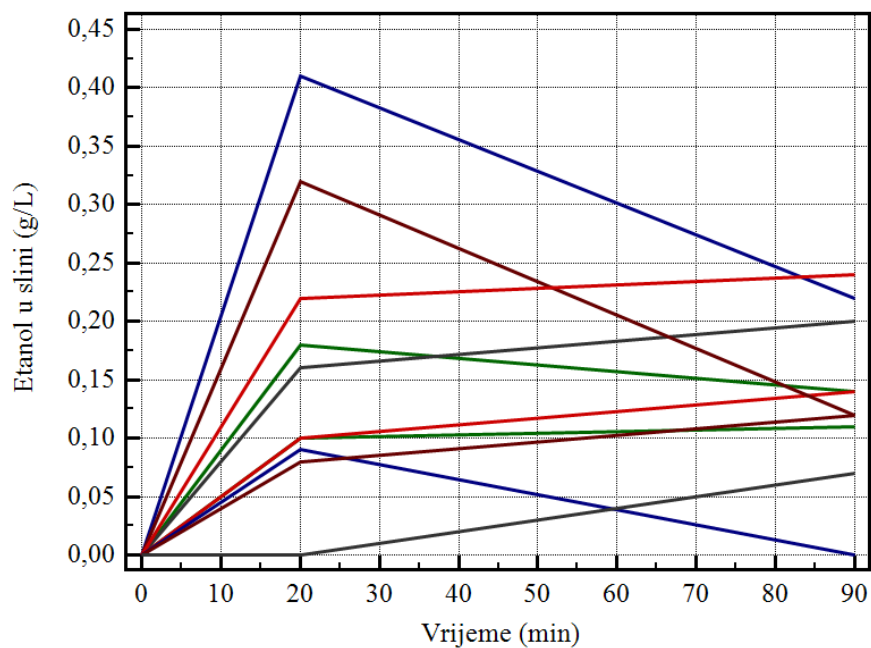
**Slika 5. Prikaz raspodjele koncentracija etanola odredivanog u urinu 10 ispitanika nakon 20 i 90 minuta, enzimskom (Enz) i metodom plinske kromatografije (Krom)**

#### 4.2.1. Kinetika etanola

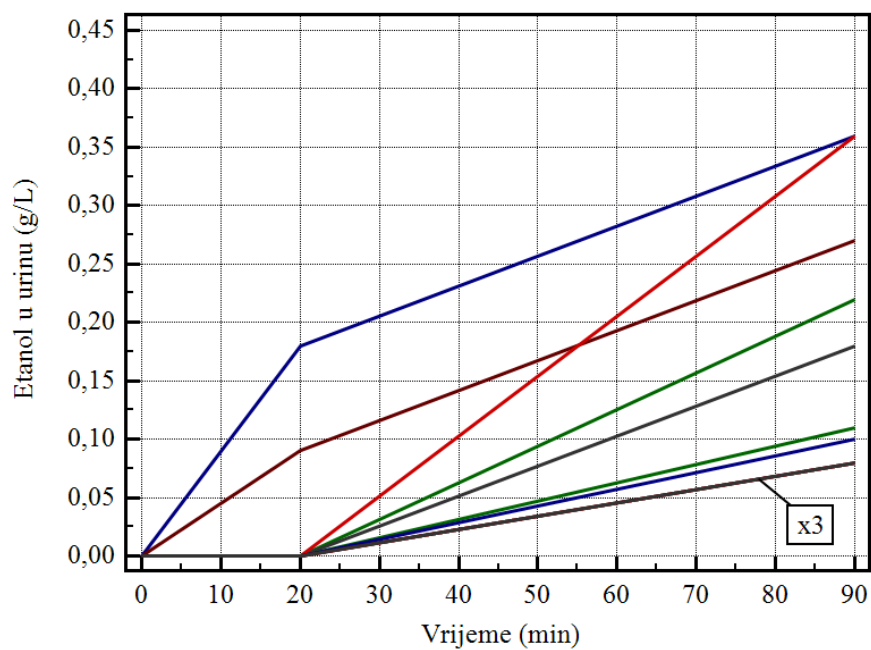
Na Slikama 6. - 8. prikazana je kinetika etanola od faze apsorpcije do eliminacije za svakog pojedinog ispitanika. Opaža se neujednačena kinetika među ispitanicima, pritom vrijednosti u 20 minuta ne predstavljaju nužno vršnu koncentraciju etanola u uzorku. U dvojice ispitanika opažene su najveće koncentracije u svim vrstama uzoraka što ukazuje na brzu apsorpcijsku i eliminacijsku kinetiku s najvišim vrijednostima etanola u svim uzorcima u 20-toj minuti.



**Slika 6. Kinetika etanola u serumu za 10 ispitanika, 20 minuta i 90 minuta nakon konzumacije 0,5 dL alkoholnog pića s 40% etanola**



**Slika 7. Kinetika etanola u slini za 10 ispitanika, 20 minuta i 90 minuta nakon konzumacije 0,5 dL alkoholnog pića s 40% etanola**



**Slika 8. Kinetika etanola u urinu za 10 ispitanika, 20 minuta i 90 minuta nakon konzumacije 0,5 dL alkoholnog pića s 40% etanola**

(3x - tri ispitanika s istim vrijednostima prikazana jednom linijom)

#### 4.2.2. Objektivni i subjektivni utjecaj etanola na ispitanike

**Tablica 7. Rezultati objektivnih i subjektivnih opažanja ispitanika 20 i 90 min nakon uzimanja 0,5 dL alkohola s 40% etanola**

Ispitanik:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pristutno obilježje nakon 20 minuta (+, - ili +/-)	Nistagmus:	+/-	+	+	-	-	+	-	+/-	-	+/-
	Drhtanje ruku:	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	-	+
	Nemogućnost hodanja po pravcu (5 m):	+	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-
	Osjećaj pijanstva, smanjene koncentracije i sumšernih misli	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Koncentracija etanola u serumu nakon 20 min (enzimska metoda, g/L)		0,25	0,39	0,18	0,09	0,08	0,33	0,2	0,12	0,11	0,04
Pristutno obilježje nakon 90 minuta (+, - ili +/-)	Nistagmus:	Nema opažanja obilježja nakon 90 minuta od konzumacije alkoholnog pića.									
	Drhtanje ruku:	Nema opažanja obilježja nakon 90 minuta od konzumacije alkoholnog pića.									
	Nemogućnost hodanja po pravcu (5 m):	Nema opažanja obilježja nakon 90 minuta od konzumacije alkoholnog pića.									
	Osjećaj pijanstva, smanjene koncentracije i sumšernih misli	Nema opažanja obilježja nakon 90 minuta od konzumacije alkoholnog pića.									
Koncentracija etanola u serumu nakon 90 min (enzimska metoda, g/L)		0,18	0,24	0,22	0,14	0,14	0,13	0,27	0,07	0,12	0,09

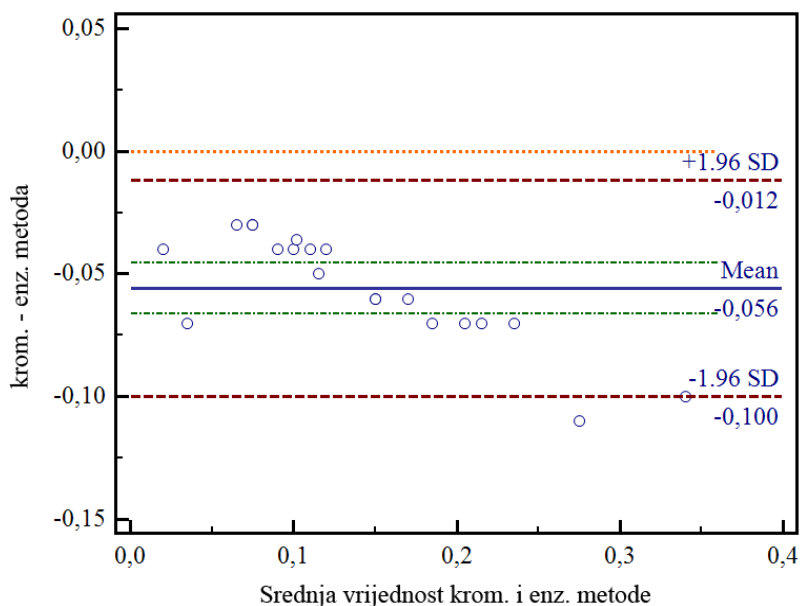
Prisutnost obilježja promatranih nakon konzumacije alkoholnog pića prikazana je tablično uz prikazane koncentracije etanola u serumu nakon 20 i 90 minute od konzumacije. Iz tablice se vidi da su pojedini ispitanici izražavali objektivne, ali i subjektivne pokazatelje utjecaja alkohola, premda su koncentracije u serumu ispod 0,5g/L. Nakon 90 minuta ispitanici ne pokazuju objektivne te također

isključuju subjektivne pokazatelje utjecaja etanola, što se povezuje s padom koncentracije etanola u serumu nakon 90 minuta od konzumacije.

#### **4.2.3. Usporedba enzimske i kromatografske metode u uzorcima sline, seruma i urina**

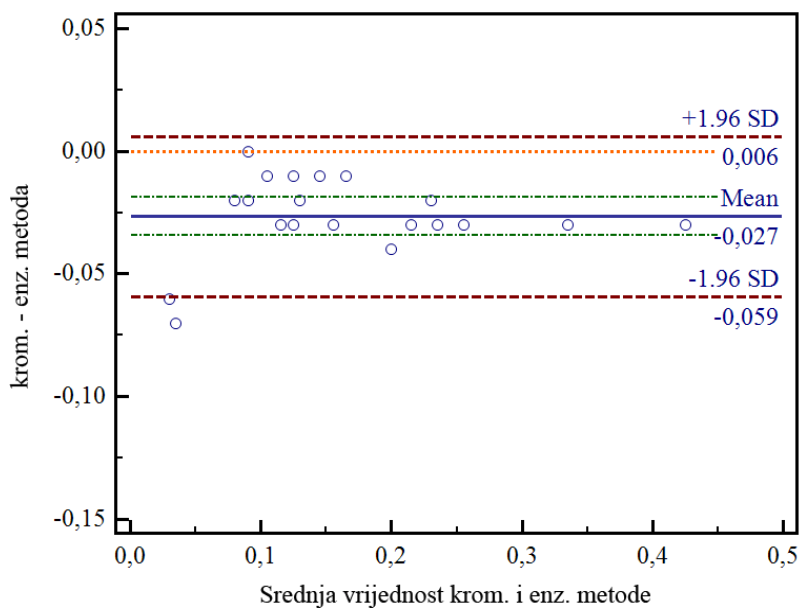
Za usporedbu metoda korištena je Bland Altmanova analiza koja je prikladnija za ovu svrhu od ponekad korištene korelacije i regresijske analize, jer se pomoću nje ne ispituje odnos među varijablama nego njihova razlika. Na taj način moguće je procijeniti mjeru u kojoj se rezultati dobiveni jednom metodom podudaraju sa onima dobivenim na drugoj metodi (26). U Bland Altmanovoj analizi podatci se prikazuju u koordinatnom sustavu gdje apscisa predstavlja srednju vrijednost mjerenja istog uzorka na dvjema metodama, a ordinata razliku između tih mjerenja. Na grafičkom prikazu također se nalazi nekoliko linija; puna plava linija predstavlja srednju vrijednost izračunatih razlika među rezultatima, dok isprekidane zelene linije prikazuju njezin 95% interval pouzdanosti. Isprekidane smeđe linije omeđuju interval podudarnosti, odnosno interval koji obuhvaća 95% izračunatih razlika među metodama. Linija jednakosti odnosno položaj na ordinati koji označava odsutnost razlika među metodama, obilježen je isprekidanom narančastom linijom.

Na slikama (9. – 10.) prikazane su razlike između kromatografske i enzimske metode za serum, slinu i urin redom, prikazane prema Bland Altmanovoj analizi. Prisutna je statistički značajna negativna srednja vrijednost razlika mjerenja za sve tri vrste uzoraka gdje su rezultati kromatografske metode niži. Izračunate srednje vrijednosti razlika kromatografske i enzimske metode su -0,056 g/L za serum, -0,027 g/L za slinu i -0,048 g/L za urin. Interval podudarnosti koji obuhvaća 95% razlika u rezultatima također je određen u odnosu na svaki uzorak i iznosi -0,012 do -0,100 g/L za serum, 0,006 do -0,059 g/L za slinu i -0,010 do -0,086 za urin.



**Slika 9. Bland Altmanov prikaz razlika koncentracija etanola mjerenih u serumu enzimskom i kromatografskom metodom**

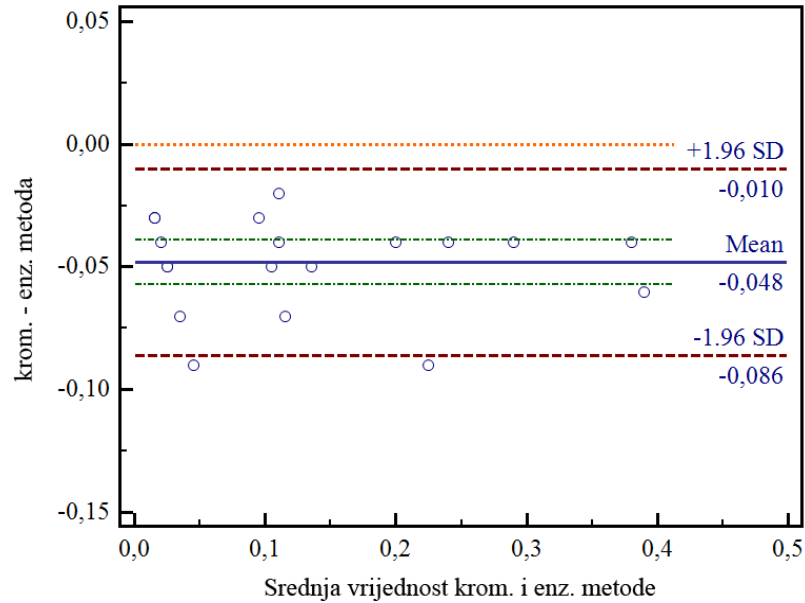
krom.- enz. metoda: razlike vrijednosti etanola u serumu određenim GC-HS-FID i enzimskom metodom, Srednja vrijednost krom. i enz. metode: srednja vrijednost etanola dobivena iz vrijednosti u serumu



**Slika 10. Bland Altmanov prikaz razlika koncentracija etanola mjerenih u slini enzimskom i kromatografskom metodom**

krom.- enz. metoda: razlike vrijednosti etanola u serumu određenim GC-HS-FID i enzimskom metodom, Srednja vrijednost krom. i enz. metode: srednja vrijednost etanola dobivena iz vrijednosti u slini



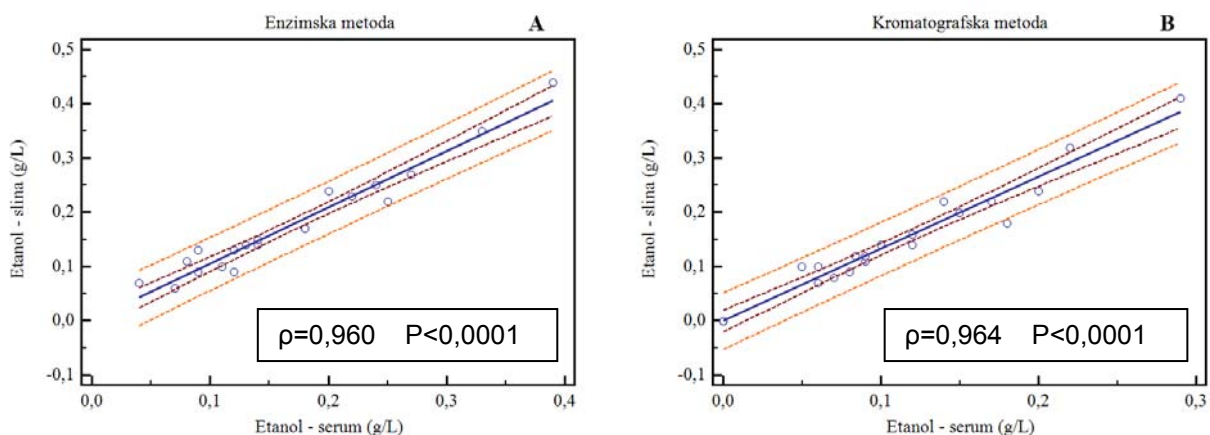


**Slika 11. Bland Altmanov prikaz razlika koncentracija etanola mjerenih u urinu enzimskom i kromatografskom metodom**

krom.- enz. metoda: razlike vrijednosti etanola u serumu određenim HS-GC-FID i enzimskom metodom, Srednja vrijednost krom. i enz. metode: srednja vrijednost etanola dobivena iz vrijednosti u urinu

#### 4.2.4. Povezanost koncentracije etanola u slini i serumu u odnosu na metodu

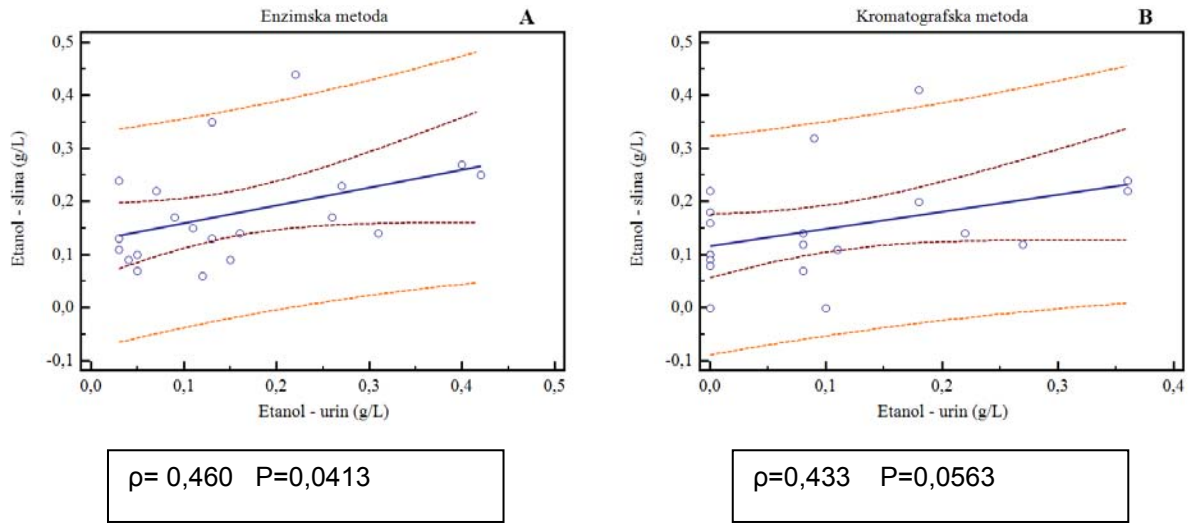
Slika 12. ukazuje na snažnu korelaciju između koncentracija etanola određenih istom metodom u slini i u serumu. Zbog snažne korelacije (prikazane izračunatim Spearmanovim koeficijentom korelacije ranga od  $\rho=0,960$  za enzimsku i  $\rho=0,964$  za kromatografsku metodu) moguće je pouzdano procijeniti koncentracije u serumu ili slini na temelju izmjerenih koncentracija u drugom uzorku.



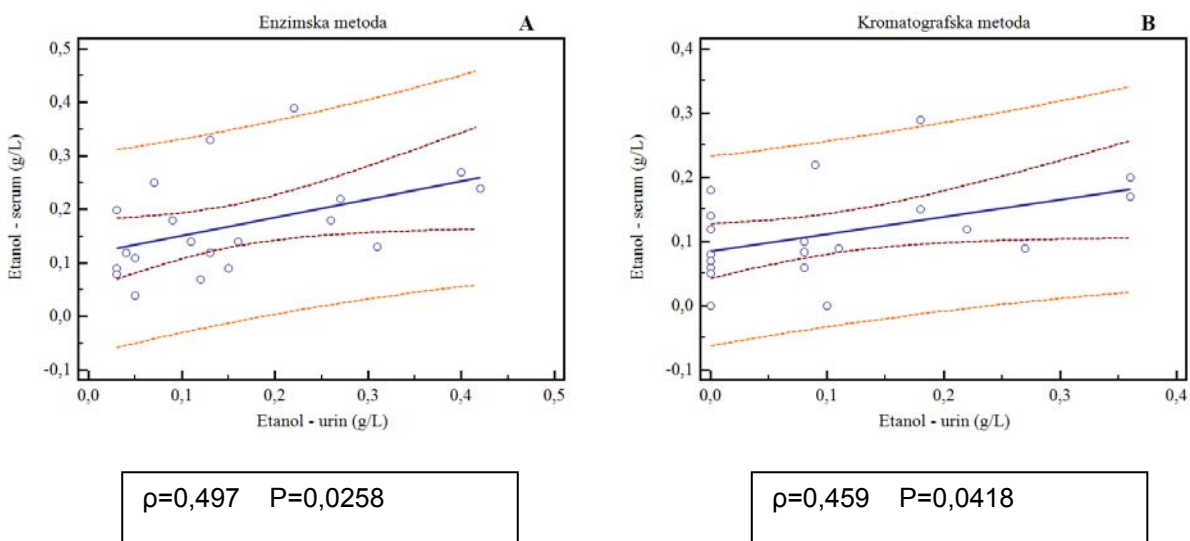
**Slika 12. Povezanost koncentracija etanola u slini i serumu za enzimsku metodu (A) i kromatografsku metodu (B)**

#### 4.2.5. Povezanost koncentracije etanola u urinu s koncentracijama u serumu i slini u odnosu na metodu

Slike 13. i 14. Ne ukazuju na snažnu korelaciju između koncentracija etanola određenih istom metodom u urinu sa koncentracijama u slini i serumu. Stoga nije moguće pouzdano procijeniti koncentracije u serumu ili slini na temelju izmjerenih koncentracija u urinu.



Slika 13. Povezanost koncentracija etanola u slini i urinu za enzimsku metodu (A) i kromatografsku metodu (B)



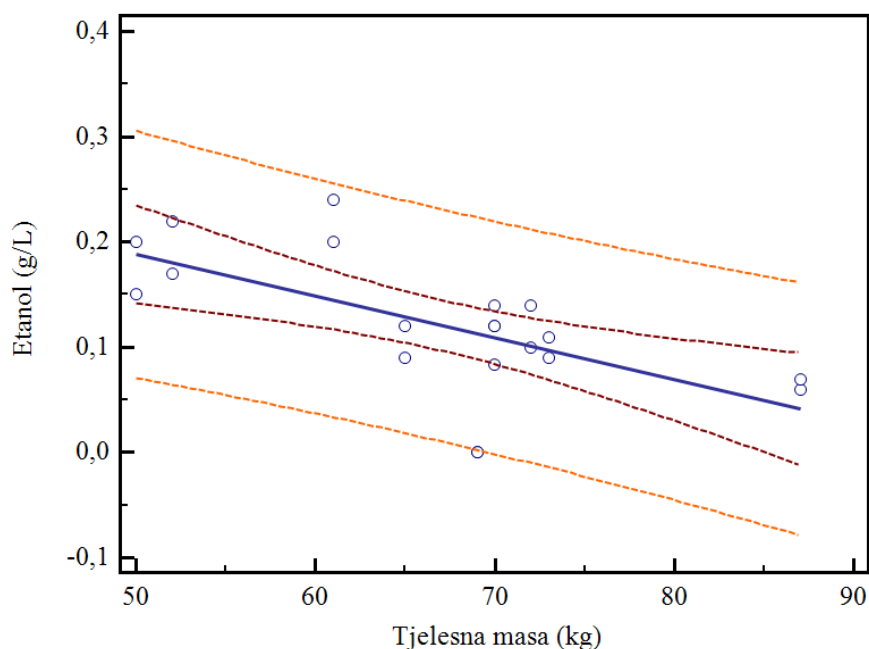
Slika 14. Povezanost koncentracija etanola u serumu i urinu za enzimsku metodu (A) i kromatografsku metodu (B)

#### 4.2.6. Usporedba koncentracija etanola u odnosu na spol i tjelesnu masu

Uspoređene su koncentracije etanola nakon 90 minuta od konzumacije u uzorcima sline i seruma prema tjelesnoj masi. Na ovaj način moguće je prikazati ovisnost postignutih koncentracija i brzine eliminacije o tjelesnoj masi.

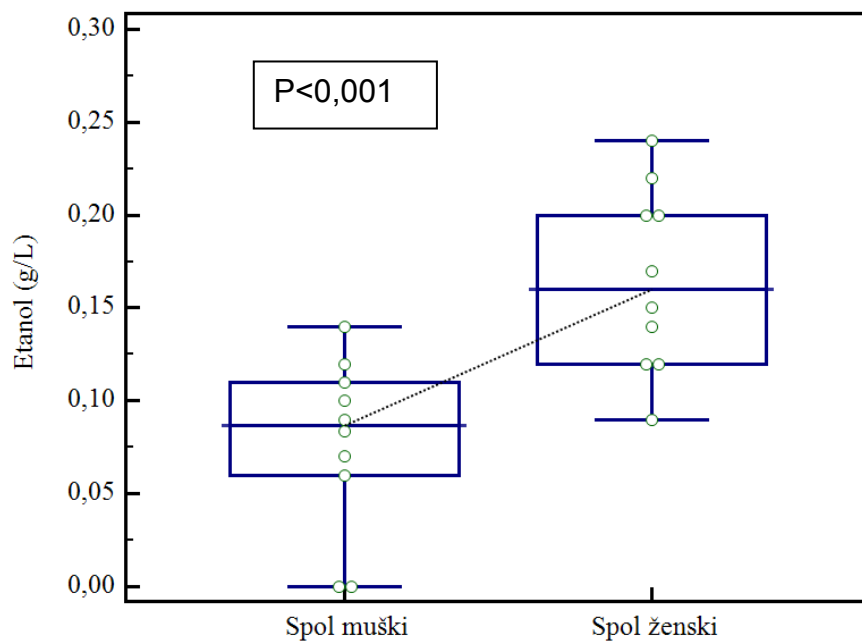
Rezultati pokazuju da sadržaj etanola umjereno dobro (ali ne i dobro ili izvrsno, prema kriterijima u Tablici 4.) i statistički značajno korelira s tjelesnom masom (Slika 15;  $\rho = -0,649$ ) što u praksi znači da će osoba s većom tjelesnom masom imati manju koncentraciju etanola, ali isto tako pokazuju da etanol nije eliminiran nakon sat i pol nakon uzimanja 0,5 dL žestokog pića.

Ženski spol pokazuje značajnu razliku u sadržaju etanola (Slika 16.) u odnosu na muškarce što se ne može pripisati samo tjelesnoj masi. Iste statističke značajke pokazuju obje mjerene metode.



$$\rho = -0,649 \quad P = 0,0001$$

Slika 15. Prikaz odnosa koncentracije etanola u serumu i slini sa tjelesnom masom ispitanika



**Slika 16. Prikaz koncentracija etanola u serumu i slini određenog GC-HS-FID metodom nakon 90 minuta prema spolu ispitanika**

## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Čokoladne praline**

Ovim istraživanjem bilo nam je u cilju procijeniti ponašanje etanola u organizmu kao i njegov utjecaj na ispitanike nakon unosa malih količina etanola. Osim uobičajenog pijenja alkoholnih pića etanol je moguće unijeti i putem nekih prehrambenih proizvoda, gdje smo kao primjer odabrali trgovačke čokoladne praline sa alkoholnim punjenjem. Procijenili smo da je konzumacija 5 pralina lako moguća u uobičajenim uvjetima konzumiranja, pa smo tu količinu primijenili i u kratkom pokusu. Količina etanola sadržana u 5 pralina je 2,55 g što je znatno niže od mase etanola prisutne u jednom standardnom piću (oko 14g), zbog čega su i očekivane koncentracije u organizmu niže. Enzimskoj metodi koju smo primijenili za mjerenje, među ostalim izvedbenim značajkama određena je granica kvantifikacije, tj limit detekcije (minimalna koncentracija analita koja treba biti prisutna u uzorku kako bi određivanje bilo pouzdano) od 0,03g/L. Mjerenjem etanola u slini nakon konzumacije čokoladnih pralina dobivene su niske vrijednosti koje se nalaze ispod granice kvantifikacije za primijenjenu metodu, zbog čega ih ne možemo smatrati pozdanima. Unatoč tome, ovako niski rezultati upućuju na to da se stvarne koncentracije nalaze u rasponu od nule do granice kvantifikacije, odnosno da nisu veće od granice kvantifikacije, što ukazuje na gotovo neznatnu prisutnost etanola u organizmu nakon konzumacije ove količine čokoladnih pralina.

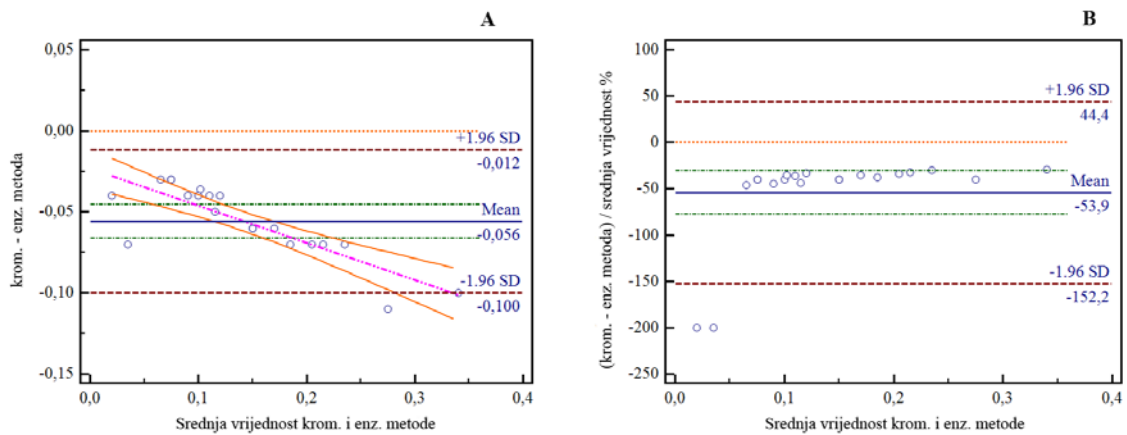
### **5.2. Kinetika etanola**

Na krivuljama koje prikazuju izmjerene koncentracije etanola u uzorcima ispitanika vidljive su značajne razlike među ispitanicima. Ove razlike pokazuju i potvrđuju značajnost faktora koji čine interindividualne razlike u apsorpciji, vršnoj koncentraciji i brzini eliminacije etanola. Za svaki od spomenutih parametara moguće je izdvojiti najznačajnije čimbenike koji na njih utječu. Brzina apsorpcije ponajviše ovisi o brzini gastričkog pražnjenja jer se većina apsorpcije odvija u tankom crijevu. Gastričko pražnjenje je pod velikim utjecajem želučanog sadržaja, pa ukoliko se etanol konzumira uz ili nakon obroka bogatog lipidima, ugljikohidratima ili proteinima, brzina apsorpcije će biti manja. Vršna koncentracija etanola ovisi najviše o dvama faktorima, brzini apsorpcije i volumenu tjelesne tekućine. Količina masnog tkiva nema značajnu ulogu u određivanju koncentracija etanola u organizmu. S obzirom da se etanol najvećim dijelom eliminira putem jetre, njezina sposobnost metaboliziranja će imati najveći utjecaj na brzinu eliminacije etanola iz organizma. Sposobnost jetre za metaboliziranje najviše ovisi o razini eksprimiranosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) koja ovisi o genetičkim faktorima, kao i vanjskim faktorima koji mogu inducirati ekspresiju enzima - uglavnom učestalosti konzumiranja etanola. (27) Osim razlika u koncentracijama etanola između uzoraka različitih ispitanika, razlike su vidljive i među vrstama uzoraka istih ispitanika. Vidljivo je da su koncentracije izmjerene u slini nešto veće od onih u serumu. Ovo opažanje moguće je objasniti

različitim udjelom vode u slini i serumu gdje je udio vode, a time i etanola veći u slini. (7) Značajnija razlika u koncentracijama prisutna je kod urina. U prvoj točki mjerenja nakon 20 minuta, koncentracije etanola su niže nego u serumu i slini, dok u drugoj točki nakon 90 minuta mjerenja pokazuju više vrijednosti nego u serumu i slini. S obzirom da etanol dospijeva u urin izlučivanjem putem bubrega, potrebno je određeno vrijeme nakon porasta koncentracije etanola u krvi da ona poraste i u urinu. Osim toga, urin koji je od ranije prisutan u mokraćnom mjehuru efektivno razrjeđuje etanol koji se izlučuje bubrezima i time dodatno ublažuje porast koncentracije u urinu. Ukoliko mjerenje izvedemo u toj fazi, nedugo nakon konzumiranja, koncentracije etanola u urinu bit će niže od serumskih. S druge strane, s obzirom na zadržavanje urina i u njemu otopljenog etanola u mokraćnom mjehuru, odjeljku koji je izoliran od cirkulacije i time od metabolizma u jetri, moguće je da koncentracije u urinu nadmaše one u krvi odnosno serumu. U kasnijoj fazi kada koncentracija etanola u krvi opada, etanol prisutan u urinu se ne metabolizira i time njegova koncentracija ostaje viša nego serumska. Može se zaključiti da kinetika etanola u urinu kasni za onom u krvi, što se može iskoristiti za procjenu prethodno postignutih koncentracija u krvi u odnosu na trenutak uzorkovanja urina. S obzirom na interindividualne razlike u apsorpciji kao i mali broj vremenskih točaka u kojima su uzorci uzimani, ne možemo pouzdano procijeniti vršne koncentracije koje su postignute kod ispitanika.

### 5.3. Usporedba metoda

Za usporedbu enzimske i kromatografske metode određivanja etanola koristili smo Bland Altmanovu analizu koja je prikladnija za ovu svrhu od ponekad korištene korelacije i regresijske analize, jer pomoću nje ne ispituje odnos među varijablama nego njihovu razliku.(26) Uzevši u obzir pretpostavku da mjerenja dobivena kromatografskom metodom više odgovaraju stvarnim vrijednostima, imalo bi smisla te vrijednosti prikazati na apscisi i u odnosu na njih prikazivati razlike metoda. Unatoč tome, za većinu slučajeva prigodnije je razlike prikazati u odnosu na srednju vrijednost odgovarajućih rezultata obje metoda. Na ovaj način izbjegavamo mogućnost krive interpretacije razlika među metodama koja može proizaći iz takvog prikaza. (28) Metode smo uspoređivali u odnosu na svaku vrstu uzorka iz kojih smo vršili analize. Izračunate srednje vrijednosti razlika kromatografske i enzimske metode su -0,056 g/L za serum, -0,027 g/L za slinu i -0,048 g/L za urin. Interval podudarnosti koji obuhvaća 95% razlika u rezultatima također je određen u odnosu na svaki uzorak i iznosi -0,012 do -0,100 g/L za serum, 0,006 do -0,059 g/L za slinu i -0,010 do -0,086 za urin. Promatranjem grafičkog prikaza za serum vidljivo je da odstupanja rastu proporcionalno sa povećanjem izmjerenih vrijednosti, što je prikazano i regresijskim pravcem na slici 17.A Linearnost povećanja razlika sa povećanjem vrijednosti dodatno potvrđuje prikaz u kojemu razlike među metodama prikazujemo kao postotak od izmjerenih vrijednosti u kojem slučaju su odstupanja približno konstantna.



**Slika 17. Bland Altmanova analiza za usporedbu enzimske i kromatografske metode, apsolutno izražene vrijednosti (A) i vrijednosti izražene kao postotak (B)**

Ovakvi podaci ukazuju na sustavnu pogrešku barem jedne od metoda, koja je proporcionalna dobivenim vrijednostima. U ovom slučaju posumnjali bismo na enzimsku metodu s obzirom da se kromatografska metoda smatra referentnom, iako bi za potvrdu ovog zapažanja kao i za točniju interpretaciju bilo potrebno učiniti veći broj mjerenja na širem rasponu vrijednosti. Zapažanje bismo mogli dijelom opravdati i činjenicom da se radi o niskim koncentracijama relativno blizu granice pouzdanosti za enzimsku metodu. Također, neka istraživanja pokazala su utjecaj matrice uzorka na raspodjelu etanola između plinovite i tekuće faze u plinskoj kromatografiji i posljedične razlike u izmjerenim koncentracijama etanola u odnosu na vodenu otopinu.(29) Promatranjem grafičkog prikaza podataka za sva tri uzorka vidljivo je da linija jednakosti (vrijednost razlike = 0) je smještena izvan intervala pouzdanosti srednje vrijednosti razlika (zelene linije), čime zaključujemo da je odstupanje metoda odnosno „bias“ statistički značajno. Kliničku značajnost ovog odstupanja treba procijeniti u odnosu na potrebe metode za koje se ona primjenjuje, odnosno same kliničke parametre koji obilježavaju trenutke u kojima se poseže za analizom. Ustanovljena odstupanja mogla bi biti od određene značajnosti za mjerenje niskih koncentracija etanola kakvima smo se bavili za potrebe ovog istraživanja, iako za svakodnevnu kliničku upotrebu u kojoj najveći udio mjerenja predstavljaju znatno veće koncentracije, ova odstupanja bi bila od manje važnosti.

## 5.4. Usporedba uzoraka

### 5.4.1. Slina i serum

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bila je procjena odnosa koncentracija etanola u različitim uzorcima i mogućnosti predviđanja koncentracija u jednoj vrsti uzorka na temelju izmjerenih koncentracija u drugom uzorku. Rezultate mjerenja analizirali smo korelacijom i regresijskom analizom. Prva

usporedba koju smo izveli bila je određivanje povezanosti koncentracija etanola u slini i serumu. Usporedbe smo napravili za svaku metodu detekcije zasebno. Na dijagramima (Slika 12.) prikazani su odnosi koncentracija u slini u ovisnosti o serumskim koncentracijama za enzimsku metodu (A) i kromatografsku metodu (B). Kako se slina sastoji najvećim dijelom od vode (>99%), a ona pak potječe iz plazme, kao i zbog činjenice da se slina ne zadržava dulje vrijeme u ustima, za očekivati je visoku korelaciju koncentracija etanola u slini i serumu. (30) Dobiveni rezultati potvrđuju to očekivanje sa izračunatim Spearmanovim koeficijentom korelacije ranga od 0,960 ( $P < 0,0001$ ) za enzimsku i 0,964 ( $P < 0,0001$ ) za kromatografsku metodu koji ukazuju na visoku i statistički značajnu korelaciju. Slični rezultati dobiveni su i u mnogim ranijim istraživanjima. (31,32) Ovakva korelacija ukazuje na vrlo dobru mogućnost predviđanja koncentracija etanola u jednoj od te dvije tjelesne tekućine poznavajući koncentraciju one druge. Jedan od najčešćih razloga analize etanola u krvi je potreba za preciznim određivanjem koncentracija u slučaju prometnih nesreća, ukoliko je policijski službenik uređajem za detekciju etanola u dahu ili drugim metodama ustanovio da je vozač pod utjecajem alkohola, ili vozač odbija pristupiti alko testu odnosno zahtijeva laboratorijsku analizu. S obzirom na umjerenu invazivnost uzimanja uzorka krvi, a odličnu korelaciju koncentracija sa onima u slini, kao alternativni postupak predlažemo moguće određivanje etanola iz sline, uzorka koji se jednostavnije i neinvazivno uzima.

#### **5.4.2. Urin sa slinom i serumom**

Osim odnosa koncentracija u slini i krvi, usporedili smo i koncentracije u urinu sa onima u slini i krvi. Promatranjem prikaza regresijske analize odnosa koncentracija u slini i urinu (Slika 13. A i B) vidljivo je da su točke znatno nepravilnije raspoređene oko izračunatog regresijskog pravca u odnosu na prikaze za odnos koncentracija u slini i serumu (Slika 12. A i B). Također, izračunati Spearmanovi koeficijenti korelacije ranga su pokazali slabiju ovisnost koncentracija etanola. Za enzimsku metodu ( $\rho = 0,460$ ,  $P = 0,0413$ ) koeficijent korelacije ukazuje na statistički značajno relativno slabu povezanost, dok je za kromatografsku metodu ( $\rho = 0,433$ ,  $P = 0,0563$ ) izračunata povezanost podjednako slaba iako je  $P$  vrijednost iznad, ali blizu odabrane granice statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ). Za odnose koncentracija u serumu i urinu rezultati su slični, što je i očekivano s obzirom na visoku korelaciju sline i seruma. Izračunati koeficijenti korelacije za enzimsku ( $\rho = 0,497$ ,  $P = 0,0258$ ) i kromatografsku ( $\rho = 0,459$ ,  $P = 0,0418$ ) metodu ukazuju na statistički značajno slabu povezanost koncentracija. Ova opažanja možemo objasniti različitim dodatnim faktorima koji utječu na koncentracije etanola u urinu u odnosu na one u serumu, poput hidriranosti organizma tj. brzine izlučivanja urina, volumenu urina u mjehuru prije konzumacije alkohola, učestalosti uriniranja, fazi apsorpcije ili eliminacije itd. Svi ovi faktori čine procjenu koncentracija etanola u serumu ili slini iz izmjerenih koncentracija u urinu nepouzdanima. Greške se mogu do neke mjere kompenzirati uzevši u obzir dinamiku izlučivanja etanola urinom i koncentracije koje kasne za onima u krvi primjenom matematičkih formula za



procjenu koncentracija. Ovakvu metodu koristi Ministarstvo unutarnjih poslova u slučaju prometnih nesreća ili drugih razloga zbog kojeg je potrebno laboratorijski odrediti koncentraciju etanola u krvi. U tim slučajevima je potrebno „unazad“ procijeniti koncentraciju etanola u trenutku prometne nesreće ili zaustavljanja vozača, jer će se zbog vremena potrebnog za dolazak vozača do laboratorija koncentracija u krvi promijeniti. Unatoč ustaljenoj praksi procjene koncentracija etanola u krvi na temelju koncentracija izmjerenih u urinu, nepouzdanost tog postupka, koju potvrđuju i druga istraživanja (33,34), još je jedan argument u prilog primjeni analiza iz sline. S obzirom da je uzorkovanje sline neinvazivan i jednostavan postupak, moguće ga je izvesti odmah po dolasku policijskog službenika na očevid prometne nesreće ili prilikom zaustavljanja vozača, čime bi se eliminirala potreba za retrogradnom procjenom koncentracija etanola, kao i za uzorkovanjem i analizom urina. Ukoliko bi ipak prošlo dulje vrijeme od nesreće do uzimanja uzorka, i dalje bi bilo moguće izvesti procjenu koncentracije na temelju odnosa koncentracija u slini i urinu umjesto u krvi i urinu.

### **5.5. Ovisnost o spolu i tjelesnoj masi**

Kako bismo ispitali neke od interindividualnih faktora koji utječu na koncentracije etanola u tjelesnim tekućinama, usporedili smo koncentracije sa tjelesnom masom, kao i sa spolom ispitanika. Na slici 15. prikazane su izmjerene koncentracije u odnosu na masu ispitanika sa prikazanim regresijskim pravcem. Također, izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije ranga ( $\rho = -0,649$   $P = 0,0001$ ) koji ukazuje na dobru povezanost varijabli. Iz grafičkog prikaza i predznaka faktora korelacije vidljivo je da je korelacija negativna, odnosno da je kod ispitanika veće tjelesne mase izmjerena koncentracija niža. Ovakav odnos možemo objasniti volumenom tjelesne tekućine. Pri većem volumenu u kojem se etanol raspodjeljuje, koncentracije će biti niže. Postoji povezanost tjelesne mase i volumena tjelesne tekućine, ona nije direktno proporcionalna jer povećanjem količine masnog tkiva tjelesna masa raste, ali volumen tjelesne tekućine se ne povećava koliko npr. povećanjem mišićne mase. Ipak, s obzirom da ovisnost postoji, prisutan je i pad koncentracija kod osoba veće tjelesne mase.

Na slici 16. prikazana je raspodjela koncentracija nakon 90 minuta u odnosu na spol. S obzirom da nema preklapanja u interkvartilnim rasponima koncentracija kod dvaju spolova, možemo zaključiti da među njima postoji razlika, pri čemu su vrijednosti kod ženskih ispitanika veće. Ovo opažanje također možemo objasniti volumenom tjelesne tekućine koji je kod ženskih osoba manji, dijelom zbog uobičajeno manjih tjelesnih masa ženske populacije, kao i zbog načelno većeg udjela masnog tkiva kod ženskih osoba. (27) Smanjen volumen u kojem se etanol raspodjeljuje rezultira višim koncentracijama u tjelesnim tekućinama.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Koncentracije etanola u slini 30, 60 90 i 120 min nakon konzumacije 5 čokoladnih pralina punjenih konjakom (2,55 g etanola ) ispod su granice detekcije i kvantifikacije. Istovjetni rezultati dobiveni su enzimskom metodom i referentnom metodom (plinskom kromatografijom).
2. Sat nakon doručka ispitanicima su određene koncentracije etanola enzimskom i referentnom metodom u serumu, slini i urinu 20 i 90 min nakon konzumacije 50 mL alkoholnog pića (15,78 g etanola). Sva mjerenja bila su iznad granice kvantifikacije (0,03 g/L), osim većine urina u vremenu nakon 20 minuta. Najviša izmjerena koncentracija bila je 0,44 g/L (u slini) nakon 20 min, a nakon 90 min vrijednosti su se kretale do 0,27 g/L (u serumu i slini).
3. Utvrđene su očekivane interindividualne razlike i povezanost koncentracija s tjelesnom masom ( $r=-0,649$ ;  $P=0,0001$ ). Svi su ispitanici imali mjerljivu količinu etanola nakon 90 min, a žene značajno višu ( $P<0,001$ ) što potvrđuje sporiju farmakokinetiku.
4. Nakon 20 min kod svih ispitanika zabilježeni su neki od subjektivnih i objektivnih pokazatelja utjecaja alkohola (nistagmus, drhtanje ruku ili nemogućnost držanja pravca u hodu), dok nakon 90 min nisu opaženi, pa čak ni kod onih ispitanika koji su imali višu koncentraciju etanola nego nakon 20 min. Zaključujemo da bi preciznija profesionalna neurološka klinička testiranja pokazala utjecaj alkohola i nakon 90 min.
5. Mjerenja u slini i krvi pokazala su istovjetnu farmakokinetiku uz zapažene više koncentracije u slini, ali bez statističke značajnosti. Urinske koncentracije pokazale su slabu i statistički neznačajnu korelaciju s koncentracijama u slini i serumu ( $r= 0,433$  do  $0,497$ ).
6. Sve gore navedene zaključke podupiru jednakovrijedno obje analitičke metode i učvršćuju u mišljenju da se nakon čašice pića ne smije za volan najmanje 90 min.
7. Usporedba analitičkih metoda pokazala je visok stupanj korelacije ( $r>0,95$ ;  $P<0,0001$ ). Wilcoxonov test potvrdio je da referentna metoda daje značajno niže koncentracije ( $P<0,001$ ). Bland-Altmanova analiza otkrila je negativnu srednju vrijednost razlika mjerenja (-0,027 g/L za slinu; -0,056 g/L za serum i -0,048 g/L za urin), a razlika mjerenja na donjoj granici 95% intervala pouzdanosti učvršćuje u zaključku da enzimska metoda ima najmanje odstupanje od referentne na uzorcima sline te da ju možemo smatrati usporedivom s referentnom metodom.
8. Nađena je snažna povezanost koncentracija etanola u serumu i slini, jednako za obje metode ( $R^2=0,949$ ;  $P<0,0001$ ). Rezultati podupiru moguću primjenu sline umjesto složenijeg i invazivnijeg postupka uzimanja krvi. Tim više što je utvrđena prihvatljiva podudarnost referentne i enzimске metode upravo u uzorcima sline.

## 7. ZAHVALE

Zahvaljujemo mr. sc. Ines Gmajnički, dipl.ing., glavnom vještaku za toksikološka vještačenja u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ravnateljstva policije u Ministarstvu unutarnjih poslova Republike Hrvatske te načelniku Centra koji nam je materijalno odobrio i opremom omogućio analitički postupak. Posebna hvala mr. sc. Ines Gmajnički i Tanji Orešić dipl. ing. na stručnim savjetima, poduci i vremenu koje su uložile za nas.

Zahvaljujemo tvrtki Siemens d.d. Hrvatska koja nam je donacijom reagensa omogućila analizu uzoraka enzimskom metodom.

Velika hvala studentima Sveučilišta u Zagrebu koji su dobrovoljno sudjelovali u ovome ispitivanju, kao i osoblju Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na lokaciji Klinike za traumatologiju na izuzetnoj susretljivosti i pomoći pri realizaciji ovog istraživanja.

Najveća hvala mentorici, izv. prof. dr. sc Nadi Vrkić, našoj nastavnici s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, na pruženom znanju i podršci, te trudu i vremenu uloženom u studentski rad, a bez koje ovo istraživanje ne bi moglo biti provedeno.

## 8. LITERATURA

1. Pemberton R., Mash C. Thermodynamic properties of aqueous non-electrolyte mixtures II. Vapour pressures and excess Gibbs energies for water + ethanol at 303.15 to 363.15 K determined by an accurate static method. *J Chem Thermodyn.* 1978.;10(9):867–88.
2. Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science.* 2004;303:1512–4.
3. Wirkner K, Poelchen W, Köles L, Mühlberg K, Scheibler P, Allgaier C. et al.. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int.* 1999;2:153–62.
4. Blednov YA, Benavidez JM, Black M, Leiter CR, Osterndorff-Kahanek E, Harris RA. Glycine receptors containing alpha2 or alpha3 subunits regulate specific ethanol-mediated behaviors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;353:181–91.
5. Snozek CLH, McMillin GA, Moyer TP. *Therapeutic Drugs and Their Management.* pp 1057-1108. U: Burtis CA, Bruns DE, eds. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7th ed., Philadelphia: Saunders, 2015.
6. Penetar DM, McNeil JF, Ryan ET, Lukas SE. Comparison among plasma, serum, and whole blood ethanol concentrations: impact of storage conditions and collection tubes. *J Anal Toxicol.* 2008;32:505–10.
7. Haeckel R, Bucklitsch I. The comparability of ethanol concentrations in peripheral blood and saliva. The phenomenon of variation in saliva to blood concentration ratios. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:199–204.
8. Swift R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. *Addiction.* 2003;98 (Suppl) 2:73–80.
9. Giang Y-S, Wang S-M, Tsai C-C, Lee M-C, Ng C-J. Analyzing alcohol in breath, blood, saliva, and urine for forensic purposes: Taiwanese population. 2007;6:1–19.
10. Honey D, Caylor C, Luthi R, Kerrigan S. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *J Anal Toxicol.* 2005;29:365–9.
11. Kristoffersen L, Stormyhr L-EE, Smith-Kielland A. Headspace gas chromatographic determination of ethanol: The use of factorial design to study effects of blood storage and

- headspace conditions on ethanol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma. *Forensic Sci Int.* 2006;161:151–7.
12. Gamella M, Campuzano S, Manso J, González de Rivera G, López-Colino F, Reviejo AJ, i ostali. A novel non-invasive electrochemical biosensing device for in situ determination of the alcohol content in blood by monitoring ethanol in sweat. *Anal Chim Acta.* 2014;806:1–7.
  13. Zakon o sigurnosti prometa na cestama 2015, Zagreb, Narodne novine br 64 (NN/64/15).
  14. Kolb B, Ettre LS. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, 2nd ed., West Sussex, Wiley, 2006.
  15. Higson SPJ. *Analytical Chemistry*. pp 464, Oxford, Oxford University Press; 2004.
  16. Samoščanec K. Suvremene metode određivanja alkohola. *Medix* 2002;8:48–9.
  17. Kott L, Hong MC. *Experimental Considerations in Headspace Gas Chromatography*. *Pharm Technol.* 2010;34:74
  18. Luterotti S. *Uvod u kemijsku analizu*. 7 izd. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2014, str. 262.
  19. Vlatko Thaller i sur. *Alkohologija*. Zagreb: Naklada CSCAA; 2002, str.367
  20. *Social and Cultural Aspects of Drinking*, 1998., <http://www.sirc.org/>, pristupljeno 5. 3. 2016.
  21. Zakon o zaštiti na radu, 2014, Zagreb, Narodne novine br.71 (NN/71/14).
  22. Saračević A, Šimundić A-M. *Stabilnost alkohola u uzorcima plazme ili seruma*. Simpozij Lokus, Vodice; 2013.
  23. Orešić T, Gmajnički I. Interni dokument Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ (RU-114/2-26, Kvantitativno određivanje etanola metodom GC-HS-FID), 2015.
  24. Mužević J. *Određivanje koncentracije alkohola u krvi*. Diplomski rad, Farmaceutsko - biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2006.
  25. Citek K, Ball B, Rutledge D a. Nystagmus testing in intoxicated individuals. *Optometry.* 2003;74:695–710.
  26. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med.* 2015;25:141–51.
  27. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16:667–85.

28. Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet*. 1995;346:1085–7.
29. Watts MT, McDonald OL. The effect of biologic specimen type on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. *Am J Clin Pathol*. 1987;87:79–85.
30. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85:162–9.
31. Gubala W, Zuba D. Comparison of Ethanol Concentrations in Saliva and Blood. *Can Soc Forensic Sci J*. 2002;35:229–35.
32. Margerl H, Schulz E. Methods of saliva analysis and the relationship between saliva and blood concentration. Proceedings of the 13th international conference on alcohol, drugs and traffic safety, Adelaide, 1995;1:43-8.
33. Winek CL, Murphy KL, Winek TA. The unreliability of using a urine ethanol concentration to predict a blood ethanol concentration. *Forensic Sci Int*. 1984;25:277–81.
34. Jones AW. Urine as a biological specimen for forensic analysis of alcohol and variability in the urine-to-blood relationship. *Toxicol Rev*. 2006;25:15–35.

## 9. SAŽETAK

**Josipa Periša i Marko Tijardović**

### **Određivanje niskih koncentracija etanola (< 0,5 g/L) u slini, serumu i urinu nakon konzumacije alkoholnih pića**

Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, vrlo često pronalazi mjesto u pićima koja se konzumiraju u različitim prigodama. Od mnogih učinaka etanola na organizam neki su opće prihvaćeni kao ugodni i jedan od razloga konzumiranja etanola. No, etanol ima ponajviše štetnih učinaka zbog čega predstavlja važnu pretragu u medicinsko-biokemijskim, toksikološkim i forenzičkim laboratorijima.

Ovim istraživanjem nastojali smo procijeniti distribuciju etanola u tjelesnim tekućinama i utjecaj na organizam nakon unosa malih količina etanola kakve su česte u društvu. Distribuciju i odnose u tjelesnim tekućinama, kao i dinamiku u vremenu ispitali smo enzimskom metodom s ADH i referentnom kromatografskom metodom (GC), što nam je ujedno omogućilo i njihovu usporedbu u niskim koncentracijskim područjima < 0,5 g/L.

Skupini 10 zdravih, trijeznih i sitih dobrovoljaca životne dobi od 21 do 28 godina uzorkovani su slina (S), krv (K) i urin (U) 20 i 90 minuta nakon konzumiranja 50 mL žestokog alkoholnog pića (15,78 g etanola). Enzimskom i GC metodom određene su koncentracije etanola u uzorcima (iz krvi je centrifugiranjem odvojen serum za analizu), a ujedno su zabilježeni subjektivni iskazi ispitanika i klinički znakovi utjecaja etanola na ispitanike. Pokusu je prethodio pilot-pokus u kojem je ispitanicima izmjerena koncentracija etanola u slini u razmacima od 30 min nakon konzumiranja 5 čokoladnih pralina punjenih konjakom (2,55 g etanola). S obje metode utvrđena je koncentracija ispod granice detekcije i granice kvantifikacije.

Glavni pokus: U svim uzorcima i točkama mjerenja izmjerene su koncentracije etanola < 0,5 g/L, a metode su pokazale visok stupanj korelacije ( $r > 0,95$ ;  $P < 0,0001$ ). Wilcoxonov test pokazao je da GC metoda daje značajno niže koncentracije ( $P < 0,001$ ). Bland-Altmanova analiza potvrdila je negativnu srednju vrijednost razlika mjerenja u g/L (S: -0,027; K: -0,056; U: -0,048), a razlika mjerenja na donjoj granici 95% intervala pouzdanosti opravdava podudarnost metoda samo za uzorke sline. Ustanovljene su očekivane razlike u koncentracijama u odnosu na spol i tjelesnu masu te su veće koncentracije izmjerene u ispitanika ženskog spola i ispitanika manje tjelesne mase. Utvrđeni su objektivni i subjektivni klinički pokazatelji različitog intenziteta nakon 20 min, dok nisu opaženi nakon 90 min, iako je više od polovice ispitanika imalo veću koncentraciju nakon 90 min nego nakon 20 min. Nađena je snažna povezanost koncentracija etanola u serumu i slini, jednako za obje metode

( $R^2=0,949$ ;  $P<0,0001$ ) što otvara mogućnosti za primjenu sline kao jednostavnije i neinvazivne metode uzorkovanja u kliničkim i toksikološkim laboratorijima. Tim više što je utvrđena prihvatljiva podudarnost metoda upravo u uzorcima sline. Koncentracije u urinu pak slabo i statistički neznajno koreliraju s koncentracijama u serumu i slini ( $r= 0,433$  do  $0,497$ ).

Kod svih ispitanika utvrđene su koncentracije koje ne prelaze sadašnjim zakonom dopuštene količine. Najveća izmjerena koncentracija bila je  $0,44$  g/L nakon 20 min te  $0,27$  g/L nakon 90 min. Zaključno, zbog velike intraindividualne razlike ispitanicima nije moguće predvidjeti sadržaj etanola u organizmu sat i pol nakon uzimanja čašice žestokog alkoholnog pića, ali je sigurno da imaju mjerljive količine, odnosno da su pod utjecajem alkohola. Stoga, oprez čak i kod društveno uobičajenog konzumiranja alkoholnih pića, s osvješćenošću da neka radna mjesta ne toleriraju koncentraciju do  $0,5$  g/L te da mnoge zemlje nemaju dopuštenu količinu alkohola u prometu.

**Ključne riječi:** analiza etanola, *headspace* plinska kromatografija, etanol u serumu, etanol u slini, etanol u urinu



## 10. SUMMARY

**Josipa Periša and Marko Tijardović**

**Determination of low concentrations of ethanol (< 0.5 g/L) in saliva, serum and urine after consumption of alcoholic beverages**

Ethanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, is very often present in the beverages that are consumed on different occasions. Out of many effects of ethanol on the body, some are generally seen as pleasant and are one of the reasons for its consumption. However, most of the effects of ethanol are adverse, which makes its determination a very important test in medical biochemistry, toxicology and forensic laboratories.

The aim of this research was to try to estimate the distribution of ethanol in body fluids and the effect on the body after consuming small amounts ethanol, which is common in different social situations. The distribution and relations in body fluids, as well as the dynamics in time were tested using the enzymatic method with ADH and a reference chromatographic method (GC), which at the same time enabled their comparison in low concentration ranges < 0.5 g/L.

A group of 10 healthy, sober and satiated volunteers from the age of 21 to 28 had their samples of saliva (S), blood (B) and urine (U) taken 20 and 90 minutes after consuming 50 mL of spirit (15.78 g of ethanol). Using the enzymatic and the GC method, concentrations of ethanol in samples were determined (centrifuge was used to separate serum from the blood for analysis), and subjective statements of subjects, as well as clinical signs of the impact of ethanol on subjects were recorded. The study was preceded by a pilot study, in which the concentration of ethanol in the subjects' saliva was measured at 30-minute intervals after having consumed 5 chocolate pralines filled with brandy (2.55 g/L ethanol). With both methods, the concentration below the detection limit and below the limit of quantification was determined.

The main study: Ethanol concentration < 0.5 g/L was measured in all samples and measurement points, and the methods have shown a high degree of correlation ( $r > 0.95$ ;  $P < 0.0001$ ). The Wilcoxon test showed that the GC method provides significantly lower concentrations ( $P < 0.001$ ). The Bland-Altman analysis confirmed the negative mean value of measurement differences in g/L (S: -0.027; B: -0.056; U: -0.048), while the measurement difference on the lower limit of 95% of confidence interval justifies the correlation of methods only for saliva samples. Expected differences in the concentrations in relation to sex and body mass have been determined and higher concentrations were measured in female subjects and in subjects with less body mass. Objective and subjective clinical signs of varying intensity were determined after 20 minutes, and observed after 90 minutes, although more than a half of subjects had a greater concentration after 90 minutes than after 20 minutes. There was a strong

correlation between the concentrations of ethanol in serum and in saliva, equal for both methods ( $R^2=0.949$ ;  $P<0.0001$ ), which opens up the possibility of using saliva as a simpler and non-invasive sampling method in clinical and toxicology laboratories. All the more reason for doing that lies in the fact that an acceptable correlation between the methods has been determined precisely in saliva samples. The concentrations in urine, on the other hand, have a weak or statistically insignificant correlation with the concentrations in serum or saliva ( $r= 0.433$  to  $0.497$ ).

In all subjects, the test resulted in concentrations that do not exceed the levels currently permitted by law. The highest measured concentration was  $0.44$  g/L after 20 minutes and  $0.27$  g/L after 90 minutes. In conclusion, due to great intra-individual differences, it is not possible to predict the content of ethanol in the subjects' bodies an hour and a half after consuming a small glass of spirit, but it is certain that the amount of ethanol in their bodies is measurable, i.e. that they are under the influence of alcohol. Therefore, it is advised to be careful even in socially normal consumption of alcoholic beverages, bearing in mind that certain jobs do not even tolerate the concentration up to  $0.5$  g/L and that alcohol in traffic is not permitted in many countries.

**Keywords:** ethanol analysis, headspace gas chromatography, serum ethanol, saliva ethanol, urine ethanol

## 11. ŽIVOTOPISI

**Josipa Periša** rođena je 7. listopada 1992. godine u Šibeniku. Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja upisuje prirodoslovno-matematički smjer u Gimnaziji Antuna Vrančića. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja postiže izvrsne rezultate na županijskim natjecanjima iz predmeta kemija i fizika, te prisustvuje na državnim natjecanjima. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja s odličnim uspjehom odlučuje svoj interes prema znanosti razviti u biomedicinskom području te upisuje studij Medicinske biokemije na Farmaceutsko–biokemijskom fakultetu u Zagrebu 2011. godine. Tijekom studija prisustvuje na raznim kongresima i simpozijima (FARMEBS, SiSK, 1. i 2. Nacionalni kongres udruge studenata farmacije i medicinske biokemije) te volontira na Glyco<sup>23</sup> Internacionalnom simpoziju glikokonjugata u Splitu 2015. godine. Iste godine osvojila je prvo mjesto u Natjecanju u kliničkim vještinama (Clinical Skills Event 2015). Sudjeluje u radu Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) kao koordinatorica za Natjecanje u kliničkim vještinama (CSE 2016).

**Marko Tijardović** rođen je 6. lipnja 1991. godine u Osijeku gdje je nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja 2006. godine upisao Tehničku školu i prirodoslovnu gimnaziju Ruđera Boškovića, smjer ekološki tehničar. Srednjoškolsko obrazovanje završava s odličnim uspjehom 2010. godine. Iste godine nakon položene državne mature upisuje diplomski studij Medicinske biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Sudjelovao je na simpozijima studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS) 2014. i 2015. godine, a na 8. kongresu Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu u Rijeci sudjelovao je kao član Organizacijskog odbora.