

BIOCHIMICA

Il benzene è un inquinante atmosferico ubiquitario e proviene sia da fonti naturali, come componente del petrolio (1-4%), ma soprattutto da fonti antropogeniche, quali le emissioni autoveicolari, emissioni da parte di industrie (che si occupano di produzione, stoccaggio e raffinazione di benzene e sostanze che lo contengono), le operazioni di rifornimento di carburante nelle stazioni di servizio e il fumo di tabacco (sia attivo sia passivo); l'apporto di queste sorgenti, al benzene totale atmosferico, è di notevole entità.

L'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato il benzene come agente cancerogeno di gruppo I (questa classe raggruppa i composti con sufficiente evidenza di cancerogenicità nell'uomo), poiché esiste una relazione causale tra agente cancerogeno e insorgenza del cancro.

Anche l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), nel 1997, ha trasferito il benzene dalla classe A2 (sospetto cancerogeno umano) alla classe A1 (cancerogeno umano accertato). Tutte le linee cellulari del sistema linfatico ed ematopoietico sono bersaglio dei metaboliti del benzene e c'è evidenza di un incremento di rischio per tutte le neoplasie linfo-ematopoietiche tra gli esposti.

Per quanto riguarda l'esposizione acuta, che viene provocata in generale da abusi o incidenti, gli effetti clinici riscontrati sono l'aritmia cardiaca, l'asfissia e gravi problemi respiratori, che a dosi elevate, possono portare alla morte.

L'esposizione a lungo o breve termine, invece, comporta fenomeni di ematossicità, immunotossicità, neurotossicità e cancerogenesi.

Studi di cancerogenicità sul benzene in roditori esposti, per ingestione e inalazione, hanno evidenziato che questa sostanza chimica induce, in ratti e topi, aplasie in differenti organi: cavità nasali e orali, fegato, stomaco, polmoni, ovaie, ecc. Nell'uomo, è stato evidenziato che l'esposizione al benzene provoca leucemia. La differente tipologia di cancro che colpisce l'uomo e i topi è ricondotta alla diversa struttura ematopoietica.

Casi di ematossicità e di insorgenza di anemia aplastica sono stati osservati attraverso studi effettuati sui lavoratori nelle industrie della gomma e nei calzaturifici, esposti per un lungo periodo a 30-210 ppm di benzene.

Serie disfunzioni del sistema immunitario, come la diminuzione dei leucociti, che sfocia in una diminuzione della capacità proliferativa dei linfociti, sono state riscontrate in lavoratori esposti a 15-75 ppm di benzene.

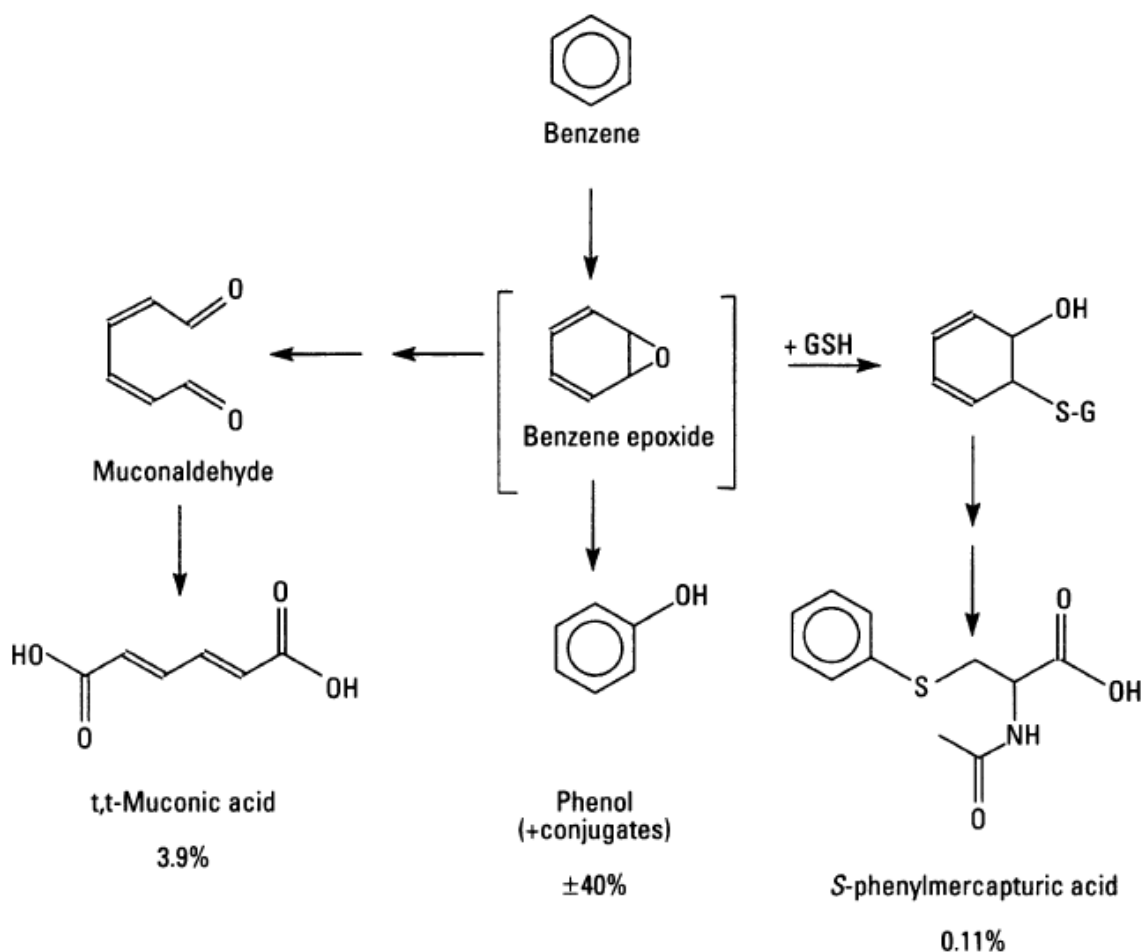
Inoltre studi *in vivo* su animali hanno anche mostrato che il benzene e i suoi metaboliti provocano aberrazioni cromosomiche sia strutturali sia numeriche; nell'uomo in misura consistente nei linfociti e nelle cellule del midollo osseo degli esposti.

È stato anche evidenziato, mediante studi su cavie, che il benzene attraversa facilmente la barriera placentale e, anche se non ci sono dati che confermano la sospetta teratogenicità di questo composto, è stata comunque dimostrata la fetotossicità su topi e conigli.

Il benzene non è un mutageno *in vitro*, infatti dei suoi effetti ematotossici e cancerogeni sono responsabili diversi suoi metaboliti.

L'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) è un metabolita urinario del benzene, che deriva dalla coniugazione dell'intermedio benzene-epossido con il glutatione. Il metabolita S-PMA è stato recentemente inserito nella lista degli indicatori biologici di esposizione a benzene. L'individuazione dell'acido S-PMA quale prodotto di biotrasformazione del benzene è del 1953.

L'acido S-fenilmercapturico è un indicatore biologico specifico di esposizione a benzene, e in questo, superiore all'acido *trans,trans*-muconico (t,t-MA), poiché non sono state finora identificate sorgenti diverse dal benzene che contribuiscano all'escrezione urinaria dell'S-PMA.



Il presente metodo consente di determinare i valori di concentrazione di acido S-fenilmercapturico totale nelle urine utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata ad una detector fluorimetrico.

EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 006	Acido S-fenilmercapturico urinario in Fluorimetria	08/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

L' *Acido S-fenilmercapturico* viene diluito con un opportuno reagente e, dopo purificazione in colonna clean-up e incubazione a 95°C, viene derivatizzato ed analizzato in HPLC.

Recupero del Metodo : 84 %

Sensibilità del Metodo : 0,5 µg/l

CV% : 8,3% intra serie
10,5% inter serie

Valori accettabili in soggetti esposti: 25 µg/g creatinina
ACGIH 2020

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 240 ml**

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 220 ml**

Reagente C – Soluzione di Lavaggio, **1 x 350 ml**

Reagente D – Soluzione Eluente, **1 x 80 ml**

Reagente E – Soluzione Diluente, **1 x 60 ml**

Reagente F – Soluzione Standard Interno, **1 x 5,5 ml**

Reagente G – Soluzione Stabilizzante 1, **1 x 5,5 ml**

Reagente H – Soluzione Stabilizzante 2, **1 x 55 ml**

Reagente I – Soluzione Derivatizzante, **1 x 6 ml**

Reagente J – Soluzione di Idrolisi, **1 x 3 ml**

Reagente L – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente N – Soluzione Bloccante, **1 x 5 ml**

Stoccare a Temperatura ambiente

Calibratore liofilo, **1 x 10 ml**

Codice Z23116

Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Reagente M1 – Fase Mobile A, **7 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile B, **3 x 500 ml**

Colonne clean-up, **100 Pz**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC in gradiente con loop da 10 µl
Detector Fluorimetrico λ_{Ex} = 395 nm λ_{Em} = 470 nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di raccolta delle urine :

Urine di fine turno. Congelare il campione a –20 °C se l'analisi deve essere differita. Si mantiene stabile per oltre 4 settimane.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test

FASE 1 : In una provetta in pyrex da 10 ml con tappo a vite in teflon pipettare :

- 450 µl di **Reagente D – Soluzione Eluente**
- 500 µl di **Reagente E – Soluzione Diluente**
- 50 µl di **Reagente L – Soluzione Test**

FASE 2 : Chiudere ermeticamente e mettere in forno a 95°C per 30 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 3 : Aggiungere a 1 ml di Soluzione Test preparata nelle Fase 1 e 2 in sequenza:
(si formerà un precipitato)

Reagente F – Standard Interno	50 µl
Reagente G – Sol. Stabilizzante 1	50 µl
Reagente H – Sol. Stabilizzante 2	250 µl
Reagente I – Sol. Derivatizzante	50 µl

Chiudere la provetta, vortexare 5 secondi ed attendere 3 minuti a Temperatura ambiente.

Aprire subito la provetta, aggiungere 40 µl di Reagente N – Soluzione Bloccante e vortexare per 5 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl del surnatante nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia tempi di ritenzione simili a quelli riportati in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. ***Importante*** : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Centrifugare i campioni urinari a 4000 giri per 5 minuti

FASE 2 : Idrolisi

In una provetta in pyrex da 10 ml con tappo a vite in teflon pipettare :

- 2 ml di **Campione/Calibratore/Controllo**
- 25 µl di **Reagente J – Soluzione di Idrolisi**

Chiudere ermeticamente le provette e vortexare per 5 secondi

Lasciar idrolizzare per 10 minuti a Temperatura ambiente

FASE 3 : Condizionamento delle colonne Clean-up.

Preparare un numero di colonne Clean-up pari al numero dei campioni da analizzare più lo Standard di Calibrazione e gli eventuali Controlli.

- Versare in colonna 2 ml di **Reagente A – Sol. di condizionamento 1** *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 2 ml di **Reagente B – Sol. di condizionamento 2** *Non portare a secco !*

Scartare l'eluato

FASE 4 : Caricamento del Campione

- Versare tutto il campione precedentemente idrolizzato (Fase 2) nelle colonne Clean-up e lasciar percolare tutto il liquido di ogni colonna Clean-up, anche con l'ausilio di un vuoto moderato, alla velocità di circa 1 ml/minuto (goccia a goccia). Scartare l'eluato.

FASE 5 : Lavaggio

- Dispensare 3 ml di **Reagente C – Sol. di lavaggio** in ogni colonna Clean-up

Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato

Scartare l'eluato

FASE 6 : Eluizione

(Per la raccolta dell'eluato utilizzare provette in pyrex da 10 ml con tappo a vite in teflon)

- Dispensare in ogni colonna Clean-up 0,5 ml di **Reagente D – Sol. eluente**

Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato

FASE 7 : Aggiungere ad ogni eluato 0,5 ml di **Reagente E – Soluzione diluente**

Chiudere ermeticamente le provette e vortexare per 5 secondi

FASE 8 : Mettere in forno a 95°C per 30 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 9 : Aggiungere in sequenza ai campioni precedentemente trattati nelle Fasi 6 e 7 (1 ml), direttamente nelle provette in pyrex da 10 ml:

Reagente F – Standard Interno	50 µl
Reagente G – Sol. Stabilizzante 1	50 µl
Reagente H – Sol. Stabilizzante 2	250 µl
Reagente I – Sol. Derivatizzante	50 µl

Chiudere le provette, vortexare 5 secondi ed attendere 3 minuti a Temperatura ambiente.

Aprire subito la provetta, aggiungere 40 µl di Reagente N – Soluzione Bloccante e vortexare per 5 secondi

Attendere un minuto, prelevare circa 500 µl di surnatante limpido e dispensarli in una vial

N.B.: il campione così preparato è stabile 2 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl del surnatante limpido nel Cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.

ACIDO S-FENILMERCAPTURICO URINARIO – Avvertenze

REAGENTE L : SOLUZIONE TEST

Ac. S-FENILMERCAPTURICO	2.000 µg/l
-------------------------	------------

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{Ex}	395 nm
λ_{Em}	470 nm
VOLTAGGIO	HIGH

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase Poroshell C18-EC 4,6 x 50 mm, 2,7 µ, è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Reverse Phase Poroshell C18-EC 4,6 x 50 mm, 2,7 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) e successivamente 15 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (95 : 5 v/v), al flusso di 1 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna al flusso iniziale riportato dal gradiente, per 20 minuti.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) al flusso di 1 ml/minuto. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v).

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo (80 : 20 v/v).

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 µl
Flusso di lavoro consigliato (vedere tabelle gradienti sotto riportate)	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 100 bar

GRADIENTE HPLC BASSA PRESSIONE :

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (ml/min)
0	85	15	1,2
9.0	82	18	1,2
20.0	82	18	1,2
20.1	30	70	1,2
23	30	70	1,2
23.1	85	15	1,2
28	85	15	1,2

GRADIENTE HPLC ALTA PRESSIONE:

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (ml/min)
0	95	5	1,2
9.0	81	19	1,2
25.0	79	21	1,2
29.0	79	21	1,2
29.1	30	70	1,2
32.0	30	70	1,2
32.1	95	5	1,2
36.0	95	5	1,2

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z23116	Calibratore per Acido s-Fenilmercapturico urinario	4 x 10 ml
Z38017	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livello 1	5 x 10 ml
Z38018	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livello 2	5 x 10 ml
Z38019	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livelli 1 e 2	2 x 5 x 10 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell EC-C18 (4,6 x 50 mm, 2,7 um)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ
Z1636/26	Provette in Pyrex da 10 ml con tappo SWL	1 x 40 PZ

ACIDO S-FENILMERCAPTURICO

(Cromatogrammi di riferimento)

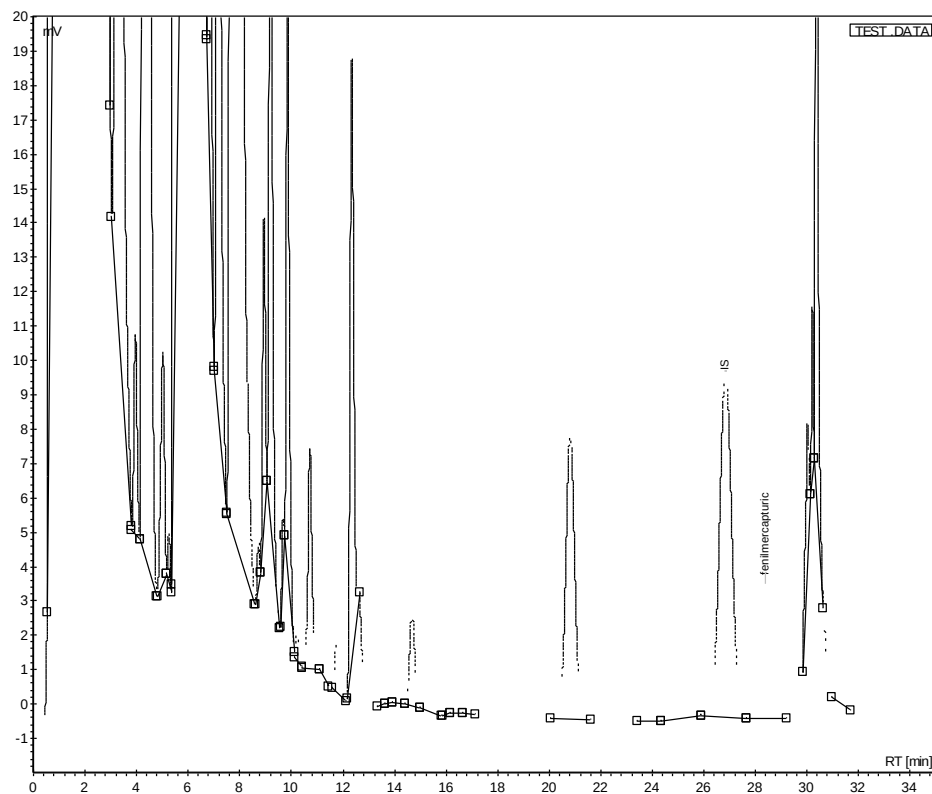


Fig. 1	Soluzione Test
	R.T. 26.80 Standard Interno
	R.T. 28.40 Ac. S-fenilmercapturico

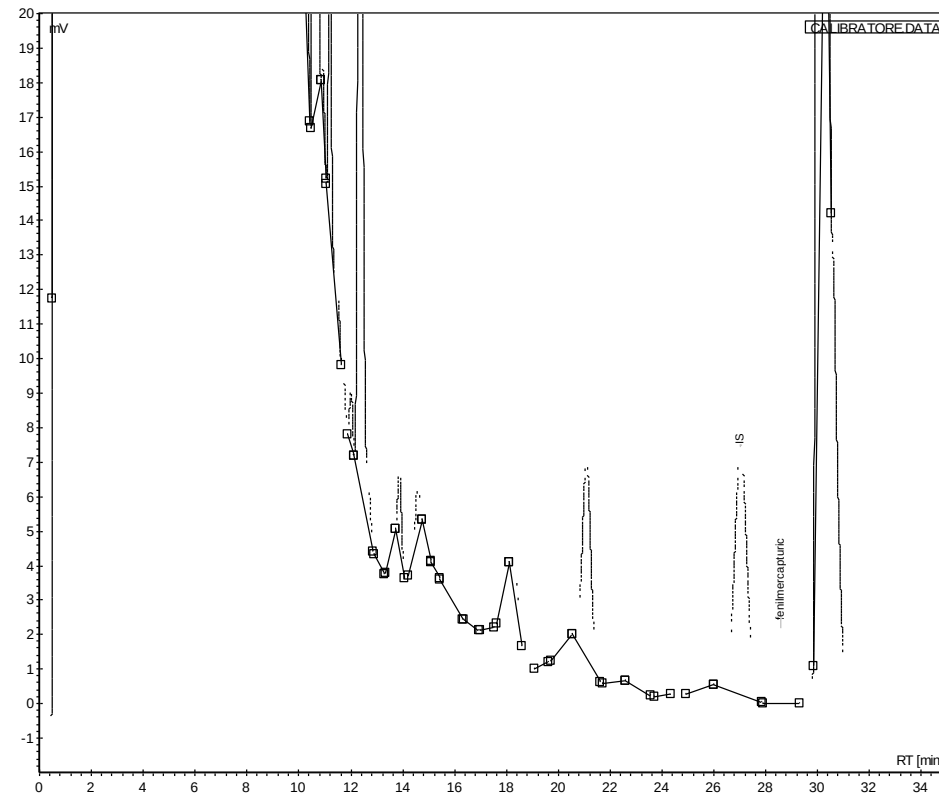


Fig. 2	Calibratore liofilo urinario
	R.T. 27.10 Standard Interno
	R.T. 28.60 Ac. S-fenilmercapturico 25 µg/l

ACIDO S-FENILMERCAPTURICO

(Cromatogrammi di riferimento)

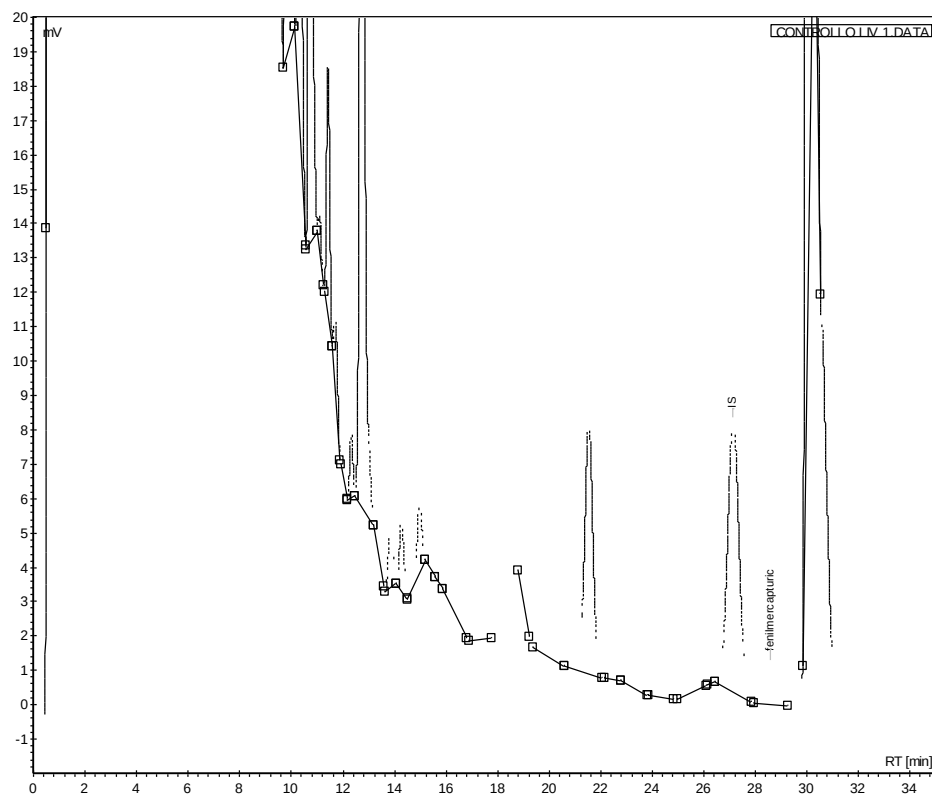


Fig. 3	Controllo ioiolo urinario livello 1
	R.T. 27.20 Standard Interno
	R.T. 28.60 Ac. S-fenilmercapturico 14,8 µg/l

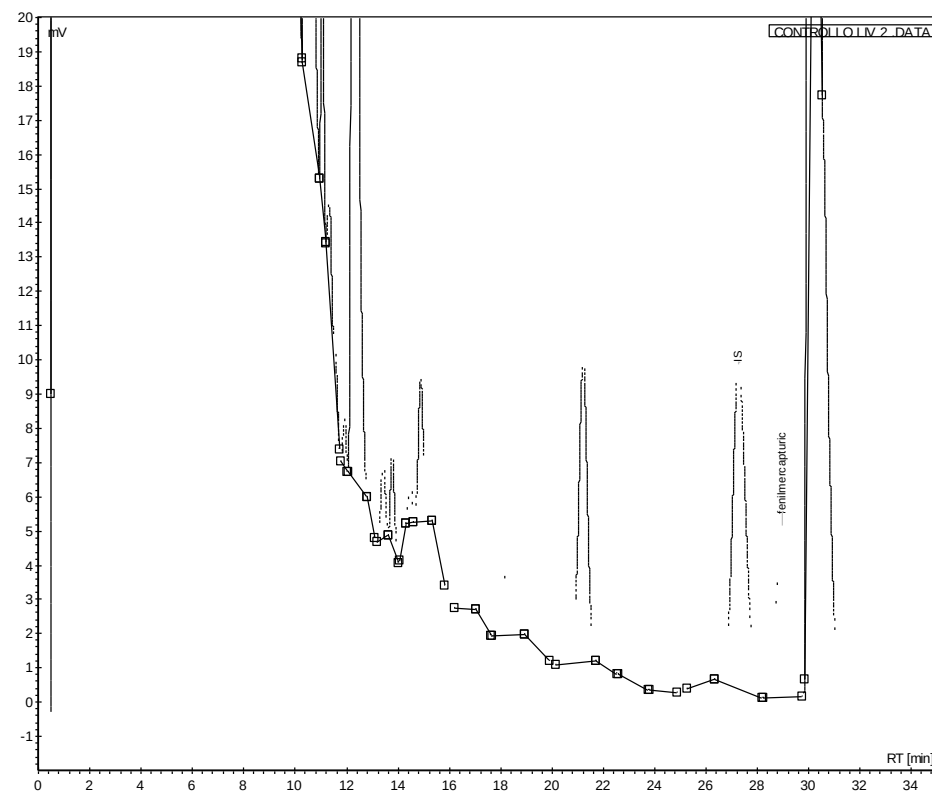


Fig. 4	Campione urinario non patologico
	R.T. 27.30 Standard Interno
	R.T. 28.90 Ac. S-fenilmercapturico 47,3 µg/l