

Acido t,t-Muconico e Acido s-Fenilmercapturico urinari in LC/MS

Cod. LC23010





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



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.

INTRODUZIONE

Il dosaggio dell'acido trans,trans-Muconico (t,t-MA) viene da tempo proposto come un marker biologico affidabile e sensibile per il monitoraggio dei lavoratori esposti al benzene.

Il benzene è una sostanza chimica frequentemente presente per es. negli oli minerali e si forma facilmente a seguito di processi di combustione. Esiste pertanto un rischio di inquinamento ambientale molto esteso. I suoi livelli nell'aria possono aumentare facilmente a causa delle emissioni da combustione di carbone e petrolio, da stoccaggio e perdita di benzene, dagli scarichi degli autoveicoli, per evaporazione dai distributori di benzina e inoltre dal momento che il tabacco contiene livelli elevati di benzene, il fumo di sigaretta è un'altra sorgente di benzene nell'aria.

L'esposizione acuta al benzene è causa di sonnolenza, vertigini, senso di stordimento, tachicardia, tremori, stato confusionale e di incoscienza e morte.

Le persone sottoposte a inalazioni di benzene per lunghi periodi (esposizione cronica) possono presentare effetti nocivi di vario genere. E' stato infatti dimostrato che il benzene ha effetti tossici sul processo di eritropoiesi ed è stato identificato anche come cancerogeno, può portare all'anemia, sanguinamento ed ha effetti dannosi sul sistema immunitario e sugli apparati riproduttivi.

Per quanto riguarda l'effetto cancerogeno, secondo l'Istituto Superiore di Sanità Americano (DHHS) il benzene è conosciuto come un cancerogeno umano. Esposizioni di lungo periodo a relativamente alti livelli di benzene nell'aria causano leucemia e pertanto è importante sottoporre le persone esposte a monitoraggio e controllo periodico del benzene.

Il benzene viene primariamente metabolizzato dal citocromo P-450 a composti fenolici. Il range di conversione metabolica del benzene all'Acido trans-trans-Muconico va dal 2 al 25% e dipende dai livelli di esposizione al benzene. Una volta ossidati, i metaboliti del benzene giocano un ruolo sostanziale nel determinare la tossicità del benzene inducendo o alcalinizzazione del DNA o stress ossidativi i quali determinano i disordini sistemici sopracitati.

L'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) è un metabolita urinario del benzene, che deriva dalla coniugazione dell'intermedio benzene-eossido 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.

CARATTERISTICHE DEL KIT

PRINCIPIO DEL METODO											
Il campione urinario viene diluito e iniettato in LC-MS/MS.											
RECUPERO DEL METODO:	101,6 – 117,2 %										
SENSIBILITÀ DEL METODO (LLOD):	Acido t,t-Muconico Acido s-Fenilmercapturico	20 ng/ml 1 ng/ml									
MINIMA CONCENTRAZIONE ANALIZZABILE (LLOQ):	Acido t,t-Muconico Acido s-Fenilmercapturico	75 ng/ml 5 ng/ml									
LINEARITÀ DEL METODO:	Acido t,t-Muconico Acido s-Fenilmercapturico	75 – 10.000 ng/ml 5 – 10.000 ng/ml									
INDICE DI ESPOSIZIONE – I.B.E. Acido t,t-Muconico	Acido <i>trans-trans</i> Muconico (t,t-MA) 500 µg/l Corrispondenti al valore Medio di Esposizione di 4 ppm di Benzene nell'aria.										
VALORI ACCETTABILI IN SOGGETTI NON ESPOSTI: Acido t,t-Muconico	< 0,3 mg/g creatinina (non fumatori) <i>Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2002;24:3 Suppl</i>										
INTERFERENZE METABOLICHE: Acido t,t-Muconico	Acido Sorbico: circa lo 0,12% dell'acido Sorbico ingerito con il cibo viene trasformato in t,t,-MA.										
VALORI ACCETTABILI IN SOGGETTI ESPOSTI: Acido s-Fenilmercapturico	< 25 µg/l										
<u>Accuratezza intra serie (errore relativo %)</u> <u>Acido t,t-Muconico:</u>	<table><tr><td>Ci</td><td>Cs</td></tr><tr><td>250 ng/ml</td><td>1.000 ng/ml</td></tr><tr><td>5,94%</td><td>2,85%</td></tr></table>	Ci	Cs	250 ng/ml	1.000 ng/ml	5,94%	2,85%				
Ci	Cs										
250 ng/ml	1.000 ng/ml										
5,94%	2,85%										
<u>Accuratezza inter serie (errore relativo %)</u> <u>Acido t,t-Muconico:</u>	<table><tr><td>Ci</td><td>Cs</td></tr><tr><td>250 ng/ml</td><td>1.000 ng/ml</td></tr><tr><td>7,54%</td><td>3,04%</td></tr></table>	Ci	Cs	250 ng/ml	1.000 ng/ml	7,54%	3,04%				
Ci	Cs										
250 ng/ml	1.000 ng/ml										
7,54%	3,04%										
<u>Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido t,t-Muconico:</u>	<table><tr><td>C LLOQ</td><td>Cm</td><td>CUP</td></tr><tr><td>75 ng/ml</td><td>500 ng/ml</td><td>1.500 ng/ml</td></tr><tr><td>5,80%</td><td>4,93%</td><td>4,76%</td></tr></table>	C LLOQ	Cm	CUP	75 ng/ml	500 ng/ml	1.500 ng/ml	5,80%	4,93%	4,76%	
C LLOQ	Cm	CUP									
75 ng/ml	500 ng/ml	1.500 ng/ml									
5,80%	4,93%	4,76%									
<u>Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido t,t-Muconico:</u>	<table><tr><td>C LLOQ</td><td>Cm</td><td>CUP</td></tr><tr><td>75 ng/ml</td><td>500 ng/ml</td><td>1.500 ng/ml</td></tr><tr><td>7,28%</td><td>7,34%</td><td>5,59%</td></tr></table>	C LLOQ	Cm	CUP	75 ng/ml	500 ng/ml	1.500 ng/ml	7,28%	7,34%	5,59%	
C LLOQ	Cm	CUP									
75 ng/ml	500 ng/ml	1.500 ng/ml									
7,28%	7,34%	5,59%									
<u>Accuratezza intra serie (errore relativo %)</u> <u>Acido s-Fenilmercapturico:</u>	<table><tr><td>Ci</td><td>Cs</td></tr><tr><td>10 ng/ml</td><td>50 ng/ml</td></tr><tr><td>3,88%</td><td>5,47%</td></tr></table>	Ci	Cs	10 ng/ml	50 ng/ml	3,88%	5,47%				
Ci	Cs										
10 ng/ml	50 ng/ml										
3,88%	5,47%										

<u>Accuratezza inter serie (errore relativo %)</u> <u>Acido s-Fenilmercapturico:</u>	Ci	Cs	
	10 ng/ml	50 ng/ml	
	4,52%	3,97%	
<u>Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido s-Fenilmercapturico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	5 ng/ml	5 ng/ml	100 ng/ml
	8,10%	2,63%	2,48%
<u>Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido s-Fenilmercapturico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	5 ng/ml	500 ng/ml	1.500 ng/ml
	14,66%	6,63%	8,19%
<u>Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std:</u>	0,9945 ± 0,0021 Acido t,t-Muconico 0,9964 ± 0,0030 Acido s-Fenilmercapturico		

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE (100 TEST)

Reagente A – Soluzione Standard Interno	1 x 10 ml	Conservare a -20 °C
Reagente B – Soluzione Diluente	1 x 100 ml	
Calibratore liofilo urinario – Livello 0	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 1	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 2	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 3	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 4	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 5	1 x 1 ml	Codice LC23016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Reagente M1 – Fase Mobile M1	2 x 500 ml	
Reagente M2 – Fase Mobile M2	1 x 500 ml	

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente, eccetto il Reagente A che va conservato a -20 °C.

Per quanto riguarda la modalità di conservazione dello Standard di Calibrazione Liofilo, essa è descritta nella scheda tecnica dedicata.

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC23016	Calibratore liofilo in urina per Muconico/Fenilmercapturico	6 x 2 x 1 ml
LC23019	Controllo liofilo in urina per Muconico/Fenilmercapturico - Livelli 1, 2	2 x 5 x 1 ml
SK23010	Starter kit per Muconico/Fenilmercapturico urinari	1 Pz
Z695970902	Colonna analitica Poroshell EC 120-C18 (100 x 4,6 mm, 4 µm)	1 Pz

DOTAZIONE STRUMENTALE MINIMA RICHIESTA

LC-MS/MS Triplo Quadrupolo con pompa binaria
MRM mode, ESI negativo

DOTAZIONE OPZIONALE

Autocampionatore
Computer gestionale.

MODALITÀ DI RACCOLTA DELLE URINE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE URINARIO

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

Rif. Bibliografico= Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene - Suppl. Vol. 3, n.1 - 2012

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1

Dispensare in una vial:

- 9000 µl di **Reagente B - Soluzione di Diluizione**
- 1000 µl di **Reagente A – Soluzione Standard Interno**

Vortex per 10 sec.

La soluzione va preparata tenendo conto del numero di campioni da analizzare, considerando che andranno utilizzati 900 µl di soluzione per campione

N.B.: lo standard interno così diluito è stabile 7 giorni a -20 °C

FASE 2

Dispensare in una vial :

- 100 µl di **Campione/Controllo/Calibratore**
- 900 µl di **Soluzione preparata nella FASE 1**

Vortex per 10 sec.

Nel caso in cui la soluzione dovesse presentare torbidità, centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti ed iniettare il surnatante.

N.B.: il campione è stabile 2 giorni a -20 °C

INIEZIONE

- Iniettare 10 µl della soluzione (o il surnatante) in HPLC.

AC. T,t-MUCONICO/AC. S-FENILMERCAPTURICO URINARI in LC/MS –

Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Poroshell 120 EC-C18 (100 x 4,6 mm, 4 µm), termostata a 40 °C. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector.

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 15 ml di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (20 : 80 v / v)** per 30 minuti scaricandola. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.** La colonna va stoccata in una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (20 : 80 v / v)**

LAVAGGIO DELL'AGO DI INIEZIONE

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

PARAMETRI SETTATI SU WATERS XEVO TQS MICRO

Capillary Voltage (kV)	3,0
Desolvation Gas (L/ora)	800
Desolvation Temperature (°C)	300

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO WATERS XEVO TQS MICRO)

Analita	Q1	Q3	CONO (V)	ENERGIA DI COLLISIONE
Acido t,t-Muconico (1)	141	52.9	14	10
Acido t,t-Muconico (2)	141	97	10	5
Acido s-Fenilmercapturico (1)	238	108.9	28	12
Acido s-Fenilmercapturico (2)	238	109	28	58
Acido t,t-Muconico-6C13	147	101.9	24	10
Acido s-Fenilmercapturico-D5 (1)	243.1	113.8	18	48
Acido s-Fenilmercapturico-D5 (2)	243.1	114	18	10

SETTAGGIO DELGRADIENTE

Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	FLUSSO (µl/min)
0	98	2	500
0.5	98	2	500
4.5	10	90	500
5.5	10	90	500
5.6	98	2	500
7.5	98	2	500

AC. T,t-MUCONICO/AC. S-FENILMERCAPTURICO URINARI IN LC/MS

(Cromatogrammi di riferimento)

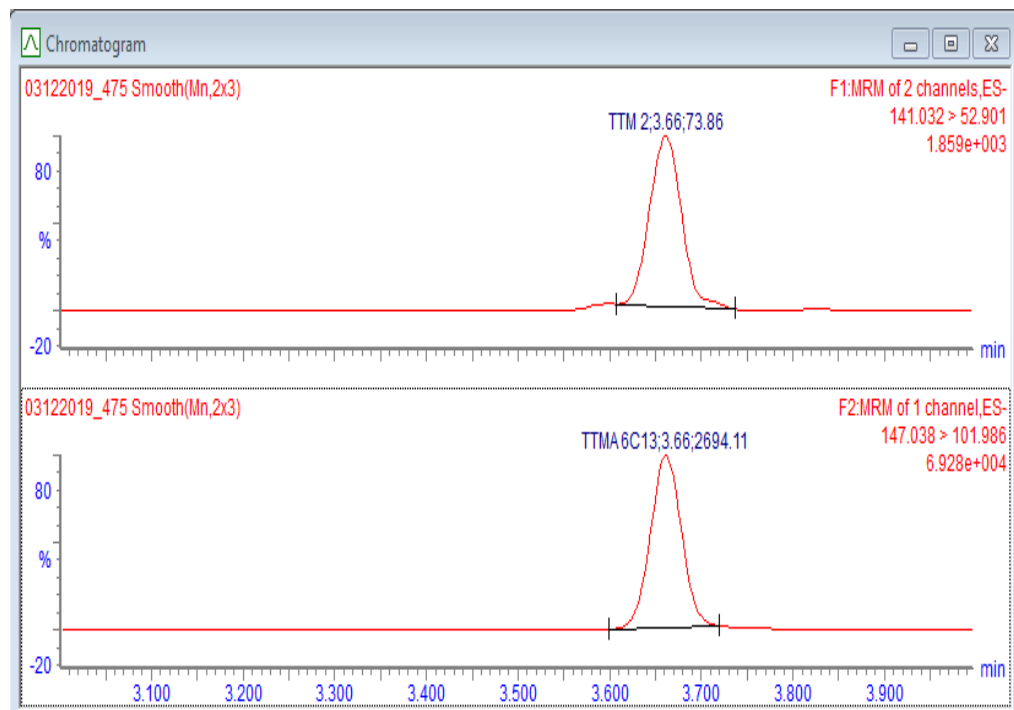


Fig. 1 :	Calibratore urinario
	Ac. T,t-Muconico (transizione 141 – 53) 750 ng/ml IS

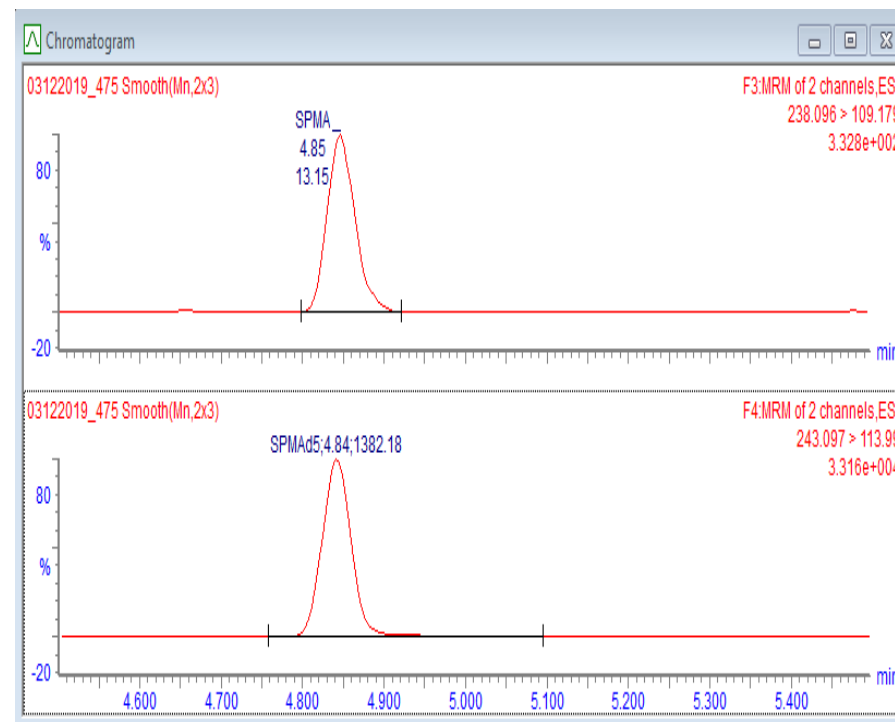


Fig. 2 :	Calibratore urinario
	Ac. S-Fenilmercapturico (transizione 238 – 109) 50 ng/ml IS

AC. T,t-MUCONICO/AC. S-FENILMERCAPTURICO URINARI IN LC/MS (Cromatogrammi di riferimento)

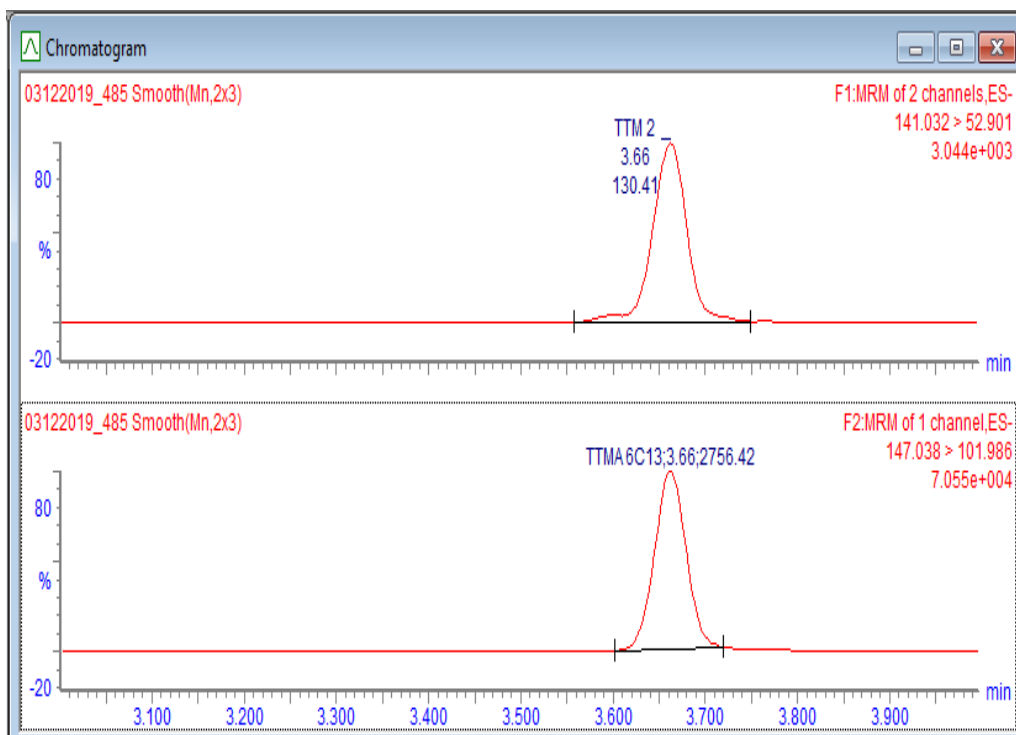


Fig. 3 :	Controllo urinario Livello 2
	Ac. T,t-Muconico (transizione 141 – 53) 1250 ng/ml IS

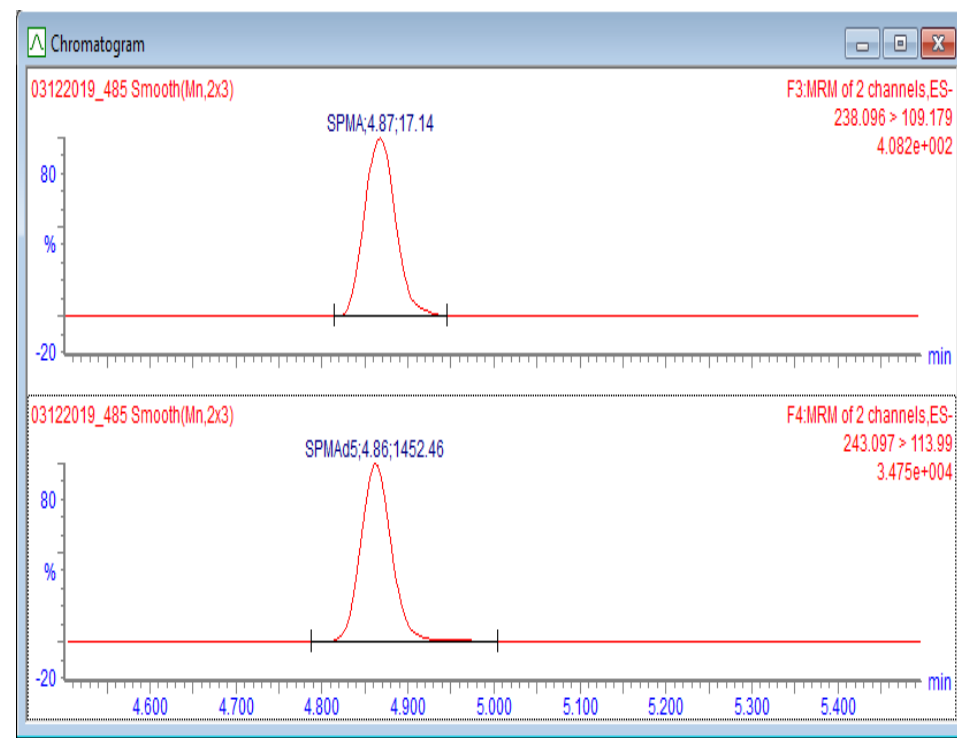


Fig. 4 :	Controllo urinario Livello 2
	Ac. S-Fenilmercapturico (transizione 238 – 109) 80 ng/ml IS



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