

Determinación de ácido trans,trans-mucónico en orina - Método de extracción en fase sólida y detección ultravioleta / Cromatografía líquida de alta resolución

MTA/MB-026/A06

NIPO 211-06-050-8

Palabras clave: ácido trans, trans-mucónico, benceno, metabolitos, orina, cromatografía líquida.

Índice

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

4. APARATOS Y MATERIAL

5. TOMA DE MUESTRA

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Preparación de la muestra: extracción en fase sólida

6.2. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3. Condiciones cromatográficas

7. CÁLCULOS

8. PRECISIÓN

9. BIBLIOGRAFÍA

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación del ácido trans,trans-mucónico (ácido t,t-mucónico) en orina mediante su extracción en fase sólida y su análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta en un intervalo de concentración 0,2 mg/l orina - 40 mg/l orina, equivalente al intervalo 0,21 mg/g creatinina - 43 mg/g creatinina, para un valor de referencia de creatinina en orina de 0,93 g/l, cuando se efectúa este tipo de corrección (véase 7.2). Este procedimiento de medida ha sido validado siguiendo los criterios establecidos en correspondiente protocolo de validación del INSHT (9.8) y los resultados de la validación se encuentran recogidos en el anexo.

El método es aplicable en poblaciones laborales potencialmente expuestas a benceno para la evaluación de la exposición global al mismo.

Se considera como interferencia el ácido sórbico, aditivo presente en ciertos alimentos y que es precursor del ácido. También, cualquier otro compuesto orgánico que presente el mismo o próximo tiempo de retención en las condiciones de operación descritas en este método, aunque en este caso puede minimizarse la interferencia modificando las condiciones cromatográficas de forma adecuada.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO



Las muestras de orina se conservan a 4 °C hasta el momento de su análisis. Se toma una alícuota de 1 ml de orina y se somete a una extracción en fase sólida con un sistema de intercambio aniónico en medio acético. El ácido t,t-mucónico contenido en la disolución eluída se analiza por cromatografía líquida de fase reversa con detección ultravioleta (HPLC-UV) a 259 nm en modo isocrático.

3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1. Agua ultrapura, de calidad 1 de acuerdo con la norma ISO 3696 (9.10)

3.2. Ácido acético 99-100% para análisis [CH₃COOH] N° CAS 64-19-7

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R) 10-35. Frases (S) (1/2-)23-26-45. Real Decreto 363/1995 (9.9).

3.3. Metanol para análisis N° CAS 67-56-1

NOTA: SUSTANCIA FÁCILMENTE INFLAMABLE Y TÓXICA. Frases (R) 11-23/25. Frases (S) 7-16-24-45. Real Decreto 363/1995 (9.9).

3.4. Ácido trans,trans-mucónico 98%, N° CAS 3588-17-8

3.5. Disolución de ácido t,t-mucónico en metanol (100,00 mg/l). Se toma 1,00 mg de t,t-mucónico y se disuelve en 10 ml de metanol.

3.6. Disolución de ácido t,t-mucónico en metanol (20,5 mg/l). Se toman 2,05 mg del ácido t,t-mucónico y se disuelven en 100 ml de metanol.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Pipeta de 1 a 10 ml

4.2. Pipetas Pasteur

4.3. Micropipetas automáticas de 100 a 1000 µl

4.4. Matraces aforados de 10 ml y 100 ml

4.5. Viales de 2 ml para inyector automático y sus tapones con septum

4.6. Frascos de polietileno para la toma de muestra de orina

4.7. Agitador ultrasónico

4.8. Densímetro

4.9. Cartuchos de intercambio aniónico fuerte para la extracción en fase sólida Superclean LC-SAX, 500 mg, 3ml, Supelco

4.10. Sistema de extracción en fase sólida

4.11. Bomba de vacío para el sistema de extracción en fase sólida

4.12. Balanza capaz de pesar 0,01 mg

4.13. Columna cromatográfica con precolumna, Hypersil ODS 4 x 100 mm, 3 µm

4.14. Sistema cromatográfico formado por cromatógrafo de líquidos con detector ultravioleta (HPLC-UV) y ordenador con un programa informático de tratamiento de datos adecuado

5. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de orina se recogen en frascos de polietileno y se mantienen a 4 °C hasta su análisis que debe tener lugar durante las dos semanas siguientes a la toma de muestra (véase [tabla 2 del anexo](#)).

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Preparación de la muestra: extracción en fase sólida

6.1.1. La muestra de orina se lleva a temperatura ambiente.

6.1.2. Se acondiciona un cartucho de intercambio aniónico (4.9), haciendo pasar a su través 3 ml de metanol y 3 ml de agua.

6.1.3. Se adiciona al cartucho 1 ml de la muestra de orina, se lava con 3 ml de ácido acético al 1% y se eluye el ácido t,t-mucónico con 3 ml de ácido acético al 10%. La disolución eluida se recoge en un matraz aforado de 5 ml, adicionando agua hasta completar este volumen.

6.1.4. La disolución final así preparada está ya lista para el análisis. Si se dispone de inductor automático de muestras se deposita aproximadamente 1 ml de esta disolución en un vial y se analiza por HPLC-UV.

6.2. Preparación de patrones y curva de calibración

6.2.1. Disolución de trabajo. Se prepara la disolución tal y como se indica en el apartado 3.6.

6.2.2. Preparación de patrones. Se preparan los distintos patrones de la recta de calibración a partir de la disolución de trabajo 6.2.1. (20,5 mg/l de ácido t,t-mucónico en metanol) tomando 1, 5, 10, 20, 35, 50, 100 y 200 microlitros de dicha disolución y completando el volumen a 1 ml con agua, obteniéndose los patrones correspondientes a 0,10; 0,51; 1,02; 1,67; 3,58; 5,12; 0,24 y 20,48 mg/l de ácido t,t-mucónico en orina.

NOTA: Todas las disoluciones han sido preparadas llevando a cabo un control gravimétrico (con balanza de precisión) de las mediciones volumétricas. Este control gravimétrico mejora la calibración y por ende la calidad de los resultados analíticos. Alternativamente las disoluciones pueden ser preparadas utilizando únicamente microjeringas y material volumétrico calibrado.

6.3. Condiciones cromatográficas

6.3.1. El equipo utilizado para el análisis consiste en un sistema cromatográfico HPLC Agilent serie 1100 con detector ultravioleta y estación de tratamiento de datos.

6.3.2. Las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de ácido t,t-mucónico en orina son las siguientes:

Columna cromatográfica:	cartucho Hypersil ODS 100 x 4 mm DI. (3 µm), Agilent
Temperatura:	25 °C
Fase móvil:	ácido acético 1% : metanol (90:10)
Longitud de onda:	259 nm
Volumen de inyección:	10 µl
Flujo	0,5 ml/min
Tiempo de retención	7,5 min
Tiempo de análisis:	9 min (patrones), 30 min (muestras orina).

7. CÁLCULOS

7.1. La concentración de ácido t,t-mucónico expresada en miligramos por litro de orina (c) se obtiene por interpolación de la altura de pico del analito en la recta de calibración, y aplicando posteriormente la siguiente expresión:

$$c = 5 \times a$$

Donde:

c es la concentración de ácido t,t-mucónico en orina (mg/l orina).

a es la concentración de ácido t,t-mucónico leída en la curva de calibración en mg/l de la disolución final (6.1.4).

7.2. Si se desean corregir los resultados de las muestras con sus respectivos valores de creatinina en orina se podrá utilizar la siguiente expresión:

$$C_{\text{creatinina}} = c / b$$

Donde:

$C_{\text{creatinina}}$ es la concentración corregida de ácido t,t-mucónico en orina (mg/g creatinina)

c es la concentración de ácido t,t-mucónico en orina (mg/l orina)

b es la concentración de creatinina en orina (g/l orina)

8. PRECISIÓN

8.1. El intervalo de trabajo se encuentra comprendido entre 0,2 - 40 mg/l orina, lo que supone un intervalo de 0,21 - 43 mg/g creatinina para un valor de referencia para la creatinina de 0,93 g/l orina.

8.2. La precisión, en términos de desviación estándar relativa, en todas las experiencias realizadas resultó ser inferior a 3,5 %. (Véanse las [tablas 1 y 2 del Anexo](#)).

8.3. El sesgo del método estimado con un material de referencia de concentración garantizada resultó ser inferior al 1% en el ensayo realizado (véase la [tabla 1 del Anexo](#)).

8.4. El límite de detección para el ácido t,t-mucónico en orina, calculado a partir de la curva de calibración según el criterio de Miller y Miller (9.6), es de 0,013 mg/l orina o bien 0,014 mg/g creatinina (valor de la creatinina en orina de 0,93 g/l).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. P.J. Boogard, N.J. van Sittert. Suitability of s-phenyl mercapturic acid and trans, trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. *Environ. Health Perspectives*. 104(6). (1996)
2. P. Ducos, R. Gaudin, A. Robert, J.M. Francin, C. Maire. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 62: 529-534 (1990).
3. S. Ghittori, L. Maestri, L. Rolandi, L. Lodola, M.L. Fiorentino, M. Imbriani. The determination of trans, trans-muconic acid in urine as indicator of occupational exposure to benzene. *Appl.occup.envIRON.hyg*, 11(3): 187-191 (1996).
4. Stephen S. Hecht. Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis*, 23 (6): 907-922 (2002)
5. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de trabajo y Asuntos sociales. (2006). [Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2006](#).
6. J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para química analítica. Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington. 100-103 (1993).
7. S. Waidyanatha, N. Roothman, S. Fustinoni, M.T. Smith, R.B. Hayes, W. Bechtold, M. Dosemeci, L. Guilan, S. Yin, S. Rappaport. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 22(2): 279-286 (2001).
8. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial. MTA/PV-IV\(2\)/98](#).
9. [Real Decreto 363/1995](#) ⁽¹⁾ de 10 de marzo (BOE de 5.6.95). Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Modificado el Anexo 1 por la Orden de 13.9.95 (BOE de 19.9.95).
10. ISO 3696:1987, Water for laboratory use - Specifications and test methods.

ANEXO VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En este anexo se recogen los datos obtenidos durante el proceso de validación del método para la determinación de ácido trans,trans-mucónico en orina siguiendo los criterios indicados en el "Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial" (9.8).

Para el cálculo de la exactitud se ha llevado a cabo una prueba intralaboratorio ([tabla 1](#)) utilizando un material de referencia conteniendo orina liofilizada con ácido t,t-mucónico denominado comercialmente ClinChekR - Control (Recipe). La muestra de control se reconstituye con agua desionizada, obteniéndose una concentración garantizada de 5,40 mg/l orina.

El ensayo de estabilidad y conservación se ha realizado con dos muestras de orina real a las que se ha añadido ácido t,t-mucónico a dos niveles diferentes de concentración.

Tabla 1
Prueba intralaboratorio de exactitud y precisión

Material de Referencia	Resultados obtenidos

	Concentración garantizada (Cg) mg/l orina	Concentración medida (Cm) mg/l orina	Nº réplicas	DER %	Sesgo %
RecipeR	5,022	4,985	7	1,2	- 0,7

DER es la desviación estándar relativa

Sesgo es el sesgo relativo expresado como $100 \cdot (Cm - Cg)/Cg$

Tabla 2
Estudio de estabilidad de las muestras

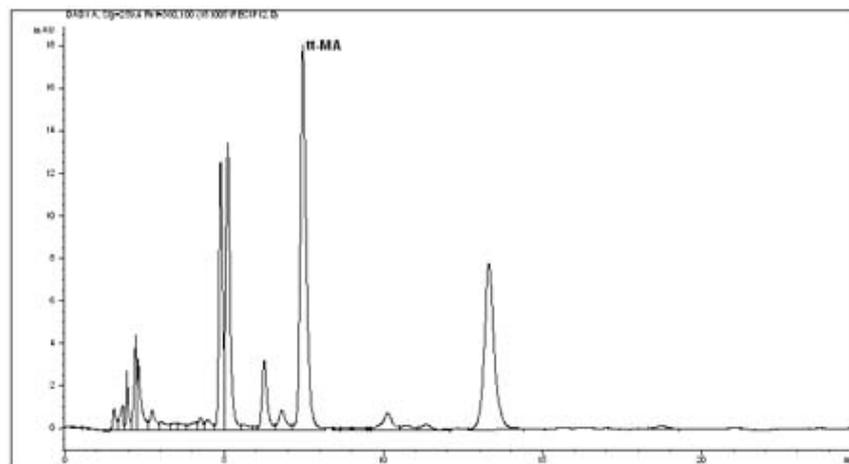
Muestra	Tiempo del análisis Temperatura de almacenamiento	Concentración mg/g creatinina	Nº de réplicas	DER %	Dif %
M-1	Inmediato	0,75	6	2,0	-
M-2	Tª ambiente	10,52	6	1,0	-
M-1	72 horas	0,71	6	3,2	- 5,0
M-2	Tª ambiente	10,57	6	1,5	+ 0,4
M-1	14 días	0,66	6	1,2	- 13,0
M-2	4º C	10,35	6	0,7	- 2,0

M-1 y **M-2** son las muestras con ácido t,t-mucónico añadido a dos niveles de concentración

DER es la desviación estándar relativa

Dif es la diferencia en porcentaje entre la concentración media obtenida en las muestras analizadas al cabo de t días y las analizadas de forma inmediata tras la toma de muestra.

Figura 1
Cromatograma del ácido t,t-mucónico en orina en las condiciones indicadas en el método



Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al
Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
 Centro Nacional de Verificación de Maquinaria
 Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)
 Tfn. 944 990 211 - 944 990 543 Fax 944 990 678
 Correo electrónico.- cnvminsht@mtas.es



ADENDA

Revisión normativa

⁽¹⁾ [Real Decreto 363/1995](#) sufre periódicamente modificaciones por lo que es conveniente consultar los listados que en esta Web se trata de mantener actualizados

