

## 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



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE EMPLEO  
Y SEGURIDAD SOCIAL



INSTITUTO NACIONAL  
DE SEGURIDAD E HIGIENE  
EN EL TRABAJO

**Título:**

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

**Autor:**

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)

**Edita:**

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)

C/ Torrelaguna, 73 - 28027 Madrid

Tel. 91 363 41 00, fax 91 363 43 27

[www.insht.es](http://www.insht.es)

**Composición:**

Servicio de Ediciones y Publicaciones del INSHT

**Edición:**

Madrid, agosto 2015

**NIPO** (en línea): 272-15-024-X

**Hipervínculos:**

El INSHT no es responsable ni garantiza la exactitud de la información en los sitios web que no son de su propiedad. Asimismo la inclusión de un hipervínculo no implica aprobación por parte del INSHT del sitio web, del propietario del mismo o de cualquier contenido específico al que aquel redirija

**Organismos participantes en el Programa Nacional de Normalización de Métodos de Toma de Muestra y Análisis:**

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
- Centro Nacional de Condiciones de Trabajo - Barcelona
- Centro Nacional de Medios de Protección - Sevilla
- Centro Nacional de Nuevas Tecnologías - Madrid
- Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya

**Dirección y Coordinación de la colección:**

Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<http://publicacionesoficiales.boe.es>

Catálogo de publicaciones del INSHT:

<http://www.insht.es/catalogopublicaciones/>





## DETERMINACIÓN DE ÁCIDO TRANS,TRANS - MUCÓNICO EN ORINA – MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y DETECCIÓN ULTRAVIOLETA / CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

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

### 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 el correspondiente protocolo de validación del INSHT (9.8) y los resultados de la validación se encuentran recogidos en el anexo A.

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 pueden 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 eluida 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.  
[CH<sub>3</sub>COOH] 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 mg/l).** Se toman 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, 3 ml, 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<sub>4</sub> 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 la tabla 2 del anexo A).

**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 (véase 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 inyector 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 primaria.** 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 di-

solución primaria 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; 10,24 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
Caudal:	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 a curva de calibración en mg/l de la disolución final (véase 6.1.3).

**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 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 A).

**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 A).

**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

- 9.1** 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)
- 9.2** 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)

**9.3** 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)

**9.4** Stephen S. Hecht. **Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer.** Carcinogenesis, 23(6): 907-922 (2002)

**9.5 Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2006.** Ministerio de trabajo y Asuntos sociales. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. (2006)

**9.6** J.C. Miller, J.N. Miller, **Estadística para química analítica.** Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington. 100-103 (1993)

**9.7** 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)

**9.8** 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.

**9.9** Real Decreto 363/1995 de 10 de marzo (B.O.E. 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 (B.O.E. 19.9.95)

**9.10** ISO 3696:1987, **Water for laboratory use** — Specifications and test methods.

## ANEXO A

## 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 ClinChek<sup>®</sup> - 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 (C <sub>g</sub> ) mg/l orina	Concentración medida (C <sub>m</sub> ) mg/l orina	Nº de réplicas	CV %	Sesgo %
Recipe <sup>R</sup>	5,022	4,985	7	1,2	- 0,7

CV es el coeficiente de variación,

Sesgo es el sesgo relativo expresado como:  $100 \cdot (C_m - C_g) / C_g$ .

Tabla 2

## Estudio de estabilidad de las muestras

Muestra	Tiempo del análisis Temperatura de almacenamiento	Concentración mg/g creatinina	Nº de réplicas	CV %	Dif %
M-1	Inmediato	0,75	6	2,0	-
M-2	T <sup>a</sup> ambiente	10,52	6	1,0	-
M-1	3 días	0,71	6	3,2	- 5,0
M-2	T <sup>a</sup> ambiente	10,57	6	1,5	+ 0,4
M-1	14 días	0,66	6	1,2	- 13,0
M-2	4 °C	10,35	6	0,7	- 2,0

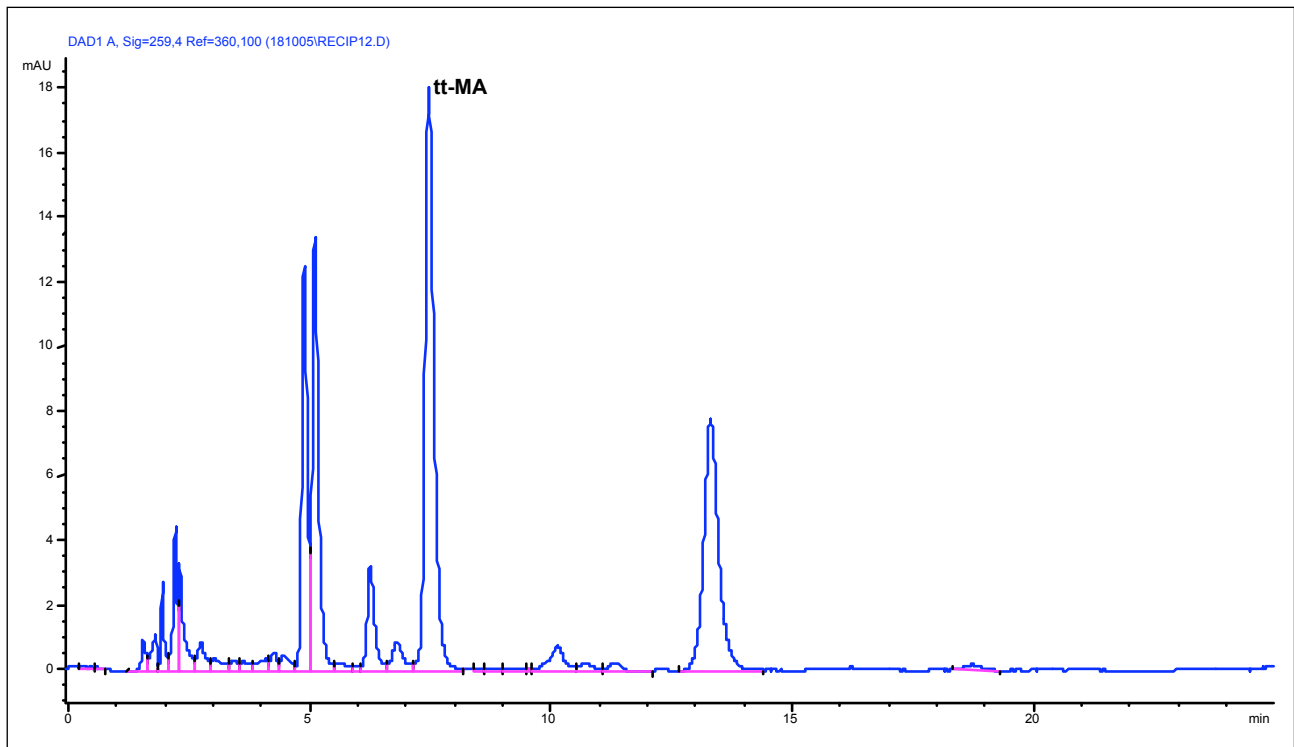
M-1 y M-2 son las muestras con ácido t,t-mucónico añadido a dos niveles de concentración,

CV es el coeficiente de variación,

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





MTA-MB-026/A06



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE EMPLEO  
Y SEGURIDAD SOCIAL



INSTITUTO NACIONAL  
DE SEGURIDAD E HIGIENE  
EN EL TRABAJO