

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Determinazione dell'acido S-fenilmercapturico  
mediante cromatografia liquida  
accoppiata a spettrometria di massa  
con trappola ionica**

Cinzia La Rocca, Luigi Turrio Baldassarri, Maria Luisa Casella  
*Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**  
**02/11**

Istituto Superiore di Sanità

**Determinazione dell'acido S-fenilmercapturico mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa con trappola ionica.**

Cinzia La Rocca, Luigi Turrio Baldassarri, Maria Luisa Casella

2002, ii, 63 p. Rapporti ISTISAN 02/11

È stato elaborato un metodo analitico strumentale per la determinazione dell'acido S-fenilmercapturico, metabolita urinario del benzene e specifico bioindicatore di esposizione, basato sull'HPLC-MS/MS, utilizzando una interfaccia elettrospray e un analizzatore a trappola ionica. Il metodo prevede la separazione su colonna a fase inversa C18, mediante un gradiente lineare, di un estratto di urina pretrattato. La determinazione è effettuata mediante rivelazione degli ioni positivi, dopo frammentazione dello ione isolato  $(M+1)^+$ , che si forma per protonazione della molecola. Lo studio è stato effettuato su soluzioni standard di acido S-fenilmercapturico, e poi messo a punto su un campione reale di urine di un soggetto non esposto professionalmente a benzene. Il metodo strumentale sviluppato in questo studio per la determinazione dell'acido S-fenilmercapturico, è caratterizzato da buona precisione (coefficiente di variazione = 4,57% su 5 iniezioni replicate) e da un'accuratezza (stimata al 6,46%) soddisfacente, e la sua elevata sensibilità (10 pg di analita iniettato) permette di rilevare il metabolita del benzene anche a livelli derivanti da basse esposizioni ambientali. La sensibilità del metodo è paragonabile a quella permessa da rivelatori spettrofluorimetrici, che però necessitano di derivatizzazione, e superiore a quella di metodi basati su gas cromatografia-spettrometria di massa, sempre dopo derivatizzazione.

*Parole chiave:* Benzene, Acido S-fenilmercapturico (S-PMA), Bioindicatore di esposizione, HPLC-MS/MS, Elettrospray, Trappola ionica

Istituto Superiore di Sanità

**S-phenylmercapturic acid determination through liquid chromatography and mass spectrometry with ion trap.**

Cinzia La Rocca, Luigi Turrio Baldassarri, Maria Luisa Casella

2002, ii, 63 p. Rapporti ISTISAN 02/11 (in Italian)

An analytical method was set up to determine S-phenylmercapturic acid (S-PMA), a benzene urinary metabolite and a specific biomarker. The method is based on HPLC-MS/MS with an electrospray interface and an ion trap analyzer. The separation of the analyte is performed on a pre-treated urine extract by a reversed-phase C18 column; a linear gradient elution is used, whilst the determination is carried out on the daughter ion obtained by fragmentation (MS/MS) of the isolated  $(M+1)^+$  ion, in the positive-ion polarity. The  $(M+1)^+$ , is formed by S-PMA protonation. This study was first set up on S-PMA standard solutions and then tested on a real urine sample of a non professionally exposed subject. The instrumental analytical method developed in this study for the S-phenylmercapturic acid is characterized by a good precision (coefficient of variation= 4.57% in 5 replicated injections), a satisfactory accuracy (an estimated 6.46%) and a high sensitivity (10 pg of injected analyte); it allows determination of the benzene urinary metabolite even at the low levels occurring in environmental exposures. The method sensitivity is comparable to spectrofluorimetric detectors, although these need one derivatization step, and it is better than gas chromatographic-mass spectrometric methods, which also need derivatization.

*Key words:* Benzene, S-Phenylmercapturic acid (S-PMA), Metabolite, Biomarker of exposure, HPLC-MS/MS, Electrospray, Ion trap

Si ringrazia la Bruker Daltonics per aver concesso l'autorizzazione a riprodurre le immagini dello spettrometro di massa Esquire LC presenti nel relativo manuale d'uso.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it/pubblicazioni](http://www.iss.it/pubblicazioni).

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>Benzene</b> .....	2
Tossicità del benzene .....	2
Benzene nell'ambiente.....	3
Benzene atmosferico.....	3
Determinazioni del benzene.....	4
Metabolismo del benzene e suoi metaboliti urinari .....	5
Determinazione dell'acido S-PMA.....	8
<b>Cromatografia e spettrometria di massa</b> .....	9
Interfacce LC-MS .....	9
Analizzatori di massa.....	11
Strumentazione usata.....	13
Stadi di lavoro della sorgente elettrospray.....	16
Formazione di ioni.....	17
Nebulizzazione .....	17
Desolvatazione.....	17
Evaporazione di ioni .....	18
Funzionamento della trappola ionica .....	18
La trappola ionica e lo spettro di massa.....	20
Sequenza di scansione .....	20
MS/MS .....	20
Parametri del tune variabili.....	21
<b>Parte sperimentale</b> .....	23
Prodotti chimici.....	23
Vetreteria .....	24
Apparecchiature .....	24
Procedure sperimentali.....	25
Procedura di estrazione urina .....	25
Procedure per l'ottimizzazione strumentale .....	25
Modalità di acquisizione e di registrazione dello spettrometro .....	25
Modalità di introduzione del campione.....	26
Calibrazione dello spettrometro .....	27
Ottimizzazione dei parametri dello spettrometro e dell'interfaccia .....	27
Condizioni HPLC.....	28
Retta di calibrazione .....	29

<b>Risultati e discussione</b> .....	30
Sviluppo del metodo.....	30
Ottimizzazione dei parametri dello spettrometro di massa.....	31
Ionizzazione in polarità negativa .....	31
Ionizzazione in polarità positiva .....	38
Ottimizzazione delle condizioni cromatografiche.....	43
Analisi di un campione di urina .....	49
Caratterizzazione delle prestazioni analitiche del metodo.....	52
Confronto delle prestazioni tra metodi in letteratura .....	55
<b>Conclusioni</b> .....	57
<b>Bibliografia</b> .....	58
<b>Appendice</b> .....	63
Parametri per la determinazione dell'acido <i>trans,trans</i> -muconico .....	65

## INTRODUZIONE

Il benzene è un accertato cancerogeno umano (1, 2) e un inquinante dell'aria ampiamente diffuso, perciò la valutazione del rischio tossicologico derivante dall'esposizione a questa sostanza è una problematica di elevato interesse.

I metodi di stima dell'esposizione, basati sulle misure dei livelli ambientali, non danno una esatta indicazione della reale dose assunta, per una serie di fattori legati al reale assorbimento dell'inspirato, al metabolismo e alle differenti vie di esposizione.

Per un'informazione più specifica, secondo più recenti orientamenti, la determinazione analitica può essere effettuata ricercando i metaboliti urinari del benzene; questi, se specifici, sono direttamente correlati alla dose assunta. Il metabolita più utilizzato dalla maggioranza dei laboratori per la valutazione dell'esposizione al benzene è l'acido *trans,trans*-muconico (t,t-MA), mediante determinazione con HPLC-UV.

In questo studio sono state messe a punto le condizioni operative in LC-MS/MS anche per questa sostanza (Appendice). Tuttavia, poiché il t,t-MA risente dell'effetto da coesposizione al toluene e dell'interferenza dell'acido sorbico, l'attenzione è stata rivolta verso un bioindicatore di esposizione con caratteristiche di notevole specificità qual è l'acido 2-acetilammino-3-fenilsulfanil-propionico, più comunemente detto acido S-fenilmercapturico (S-phenylmercapturic acid, S-PMA).

Il presente lavoro descrive lo sviluppo di un metodo analitico strumentale, basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), per la determinazione dell'acido S-PMA urinario.

L'obiettivo è elaborare un metodo analitico caratterizzato da soddisfacenti precisione e accuratezza e da una sensibilità possibilmente superiore a quella delle tecniche analitiche attualmente impiegate, così da consentire la determinazione dell'acido S-PMA anche a bassi livelli di esposizione ambientale.

# BENZENE

## Tossicità del benzene

L'acido 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 (3, 4).

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 (1).

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) (2). Infatti sulla base di studi epidemiologici correlati ad eventi accidentali o ad esposizioni professionali, è stata osservata una associazione tra esposizione al benzene e leucemia mieloide nell'uomo (5, 6). 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 (7, 8).

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 (9, 10).

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 (11).

Il benzene, quindi, provoca numerosi danni alla salute umana: gli effetti tossici e cancerogeni si ripercuotono sul sistema ematopoietico, costituito da midollo osseo e sistema linfatico, il quale presiede alla formazione degli elementi figurati del sangue (globuli bianchi, piastrine, globuli rossi).

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 (12-14).

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 (15, 16).

Inoltre studi *in vivo* su animali hanno anche mostrato che il benzene e i suoi metaboliti provocano aberrazioni cromosomiche sia strutturali sia numeriche (17, 18, 19); nell'uomo in misura consistente nei linfociti e nelle cellule del midollo osseo degli esposti (20, 21).

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 (22), è stata comunque dimostrata la fetotossicità su topi e conigli (23).

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

## Benzene nell'ambiente

Il benzene è un inquinante atmosferico ubiquitario e proviene sia da fonti naturali, come componente del petrolio (1-4%) (24, 25), 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 (26-28).

Nell'ambiente, il benzene esiste prevalentemente in fase vapore, con un tempo di residenza che va da qualche ora a pochi giorni, a seconda delle condizioni climatiche, della concentrazione di radicali idrossilici, della presenza di ossidi di azoto e zolfo.

Attraverso l'acqua piovana viene trasferito dall'ambiente aereo a quello terrestre e acquatico con conseguente contaminazione della superficie e dell'ambiente acquatico (la sua solubilità in acqua è di circa 1000 mg/l), tuttavia in quest'ambiente il tempo di residenza è di poche ore a causa della volatilizzazione, per questo motivo il fenomeno di adsorbimento su sedimenti è poco rilevante (29).

Per quanto riguarda il benzene presente nel suolo, grazie alla sua elevata volatilità, può facilmente passare in aria, e, se rilasciato nel sottosuolo, può inquinare le acque sotterranee (30).

In condizioni aerobiche, sia in acqua sia nel suolo, il benzene è rapidamente degradato da batteri in lattato e piruvato, attraverso intermedi catecolici e fenolici.

Nel sottosuolo, in condizioni anaerobiche, invece, la degradazione avviene molto più lentamente (la durata si misura in settimane o mesi, piuttosto che in ore). Ad oggi non è stato evidenziato un bioaccumulo in organismi acquatici o terrestri (31).

## Benzene atmosferico

La fonte principale di benzene nelle aree urbane è il traffico autoveicolare (32, 33). Con il Decreto ministeriale italiano del 1994 (Decreto dei Ministri dell'Ambiente e della Sanità del 25 novembre 1994) sono stati stabiliti obiettivi di qualità dell'aria urbana per il benzene di  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dal 1° gennaio 1996, ridotti a  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dal 1 gennaio 1999 (34). La recente direttiva 2000/69/CE del Parlamento europeo e del consiglio impone agli Stati membri della Comunità europea di non superare il limite di  $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dal 13 dicembre 2000. In Italia, uno studio di valutazione dell'esposizione personale a benzene su un campione di 48 addetti alle stazioni di rifornimento, ha mostrato livelli medi di esposizione di  $315,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  comparata a  $28,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di livelli medi di fondo locale (27).

Negli USA, i livelli ambientali di benzene, misurati in aree remote rurali, sono in media di  $0,51 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di aria (0,16 ppb), mentre, nei centri urbani e suburbani si misurano concentrazioni medie di circa  $5,76 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (1,8 ppb) (28); dove sono presenti industrie che producono o utilizzano benzene e dove è intenso il traffico autoveicolare sono stati rilevati picchi di  $112 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (35 ppb) (35).

Negli ambienti confinati, la sorgente principale di benzene sembra essere il fumo di sigaretta, infatti sono stati trovati valori superiori di benzene nelle abitazioni di fumatori ( $16 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), rispetto a quelle di non fumatori ( $9,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) durante l'autunno e l'inverno, mentre i valori sono comparabili in estate, in entrambe le abitazioni ( $4,4-4,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (36).

Nel 1946 il benzene fu introdotto, per la prima volta, in una lista contenente valori limiti per alcune sostanze chimiche, redatta dall'ACGIH: nel corso degli anni, a seguito di numerosi studi tossicologici sul benzene, questo valore è stato sensibilmente diminuito.

Altri organismi, come l'OSHA (Occupational Safety and Health Administration) e il NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) hanno effettuato valutazioni della tossicità del benzene, allo scopo di disciplinare l'esposizione (37, 38).

Il livello limite (valore limite di soglia-media ponderata nel tempo: Threshold Limit Value-Time Weighted Average, TLV-TWA) attuale, per gli ambienti di lavoro, è di 0,5 ppm (corrispondente a 1,6 mg/m<sup>3</sup>) (2) e risulta essere in linea con l'attuale esposizione professionale nei Paesi industrializzati: difatti soltanto l'1% circa dei professionalmente esposti a benzene sono soggetti a valori superiori a 10 ppm, mentre il 90% sono esposti a livelli inferiori o pari a 0,5 ppm (39).

## Determinazioni del benzene

Molti studi hanno mostrato la stretta correlazione tra esposizione a benzene ed effetti dannosi per la salute umana, per questo motivo, nel corso degli anni, sono stati sviluppati e validati metodi per la determinazione di questa sostanza, ricercando tecniche analitiche sensibili, specifiche e di semplice applicazione (40, 41). La determinazione di questo composto organico può essere condotta come misura della concentrazione in aria, sia all'aperto che in ambienti confinati, oppure attraverso l'aria espirata, il sangue o le urine, infine come stima indiretta, misurando la concentrazione di suoi metaboliti o di suoi addotti in varie matrici biologiche (42).

Sebbene la misura di benzene nell'aria espirata, rappresenti una misura molto specifica, i campioni devono essere raccolti immediatamente dopo l'esposizione o entro breve tempo. Questo è il motivo principale, insieme a fattori estranei che influenzano l'analisi, come patologie del sistema respiratorio e il tipo di impegno fisico affrontato dagli esposti, che rende la determinazione del benzene attraverso l'aria espirata un metodo di analisi poco pratico per il monitoraggio degli esposti (42).

La misura del benzene nel sangue è stata proposta come metodo di monitoraggio biologico, tuttavia la tecnica risulta invasiva, inoltre a basse concentrazioni la determinazione del benzene ematico richiede analisi molto sofisticate. Per questi motivi si preferiscono altre tecniche di analisi, come la determinazione del benzene urinario.

La misura del benzene urinario è preferita a quella ematica, perché come procedura non invasiva, è più adatta per analisi di routine (43). Nello studio di professionalmente esposti, vi è una limitazione dovuta al fatto che l'esposizione occupazionale a bassi livelli può essere interferita dal fumo di tabacco, dato che il fumo di sigaretta costituisce per i fumatori un importante contributo all'assunzione giornaliera.

Una misura indiretta per la determinazione del benzene si riferisce ad analisi di addotti con proteine o DNA, infatti il benzene è un agente cancerogeno, che come altre sostanze chimiche cancerogene si legano a DNA o proteine, dando inizio al processo di cancerogenesi (44-46).

Poiché non è possibile prelevare campioni di organi bersaglio di questo inquinante chimico, quali il midollo osseo, sono stati studiati addotti di nucleotidi e proteine ematiche (emoglobina, albumina) come surrogati dei tessuti bersaglio. La stabilità degli addotti con il DNA e le proteine, permette il monitoraggio anche dopo l'esposizione, sebbene attualmente molti dei biomarcatori molecolari non siano ancora validati.

Una tecnica alternativa, diffusamente usata, consiste nella valutazione dell'esposizione al benzene attraverso i suoi metaboliti, considerati indicatori biologici di esposizione. Con il termine bioindicatore, in generale, si indica una misura riflettente una interazione tra un sistema biologico e un potenziale rischio, di natura chimica, fisica o biologica (47, 48). L'indicatore biologico di esposizione è costituito da una sostanza xenobiotica o da un suo metabolita (prodotto di interazione tra la sostanza esogena e una molecola o cellula bersaglio) misurato in un compartimento dell'organismo. Questo tipo di bioindicatore conferma e valuta l'esposizione di un individuo o di una popolazione a una particolare sostanza.

Esistono altre categorie di indicatori biologici, come quelli di effetto e di suscettibilità. I primi danno informazioni su alterazioni comportamentali, fisiologiche e biochimiche di un organismo; i secondi indicano la capacità, genetica o acquisita, di un organismo a rispondere all'esposizione di uno specifico xenobiotico (48).

Per essere utilizzati come biomarcatori di esposizione, i metaboliti devono possedere una buona specificità e sensibilità, intendendo, rispettivamente, che un preciso bioindicatore possa essere ricondotto univocamente a un determinato agente tossico e che sia presente anche a bassi livelli di esposizione. Molti metaboliti urinari del benzene rispondono a questi requisiti.

Si preferisce effettuare una determinazione indiretta del benzene, attraverso i suoi metaboliti urinari, poiché questi possiedono, nell'organismo, un'emivita maggiore rispetto al benzene tal quale. L'analisi attraverso i metaboliti, quindi rappresenta una migliore integrazione della dose inalata su un periodo di tempo significativo (42).

Dunque, attualmente, per la valutazione dell'esposizione al benzene atmosferico si utilizzano con crescente frequenza tecniche analitiche che si basano sulla ricerca di indicatori biologici di esposizione, che hanno origine da un complesso processo metabolico.

## Metabolismo del benzene e suoi metaboliti urinari

L'assorbimento del benzene avviene principalmente attraverso inalazione di vapori e secondariamente attraverso l'epidermide (42). Una frazione del benzene inalato è escreta tal quale nell'aria esalata: alcuni studi hanno provato che, in un uomo, la frazione eliminata attraverso l'aria espirata, varia tra 10% e 50% a seconda dell'attività metabolica (5, 18, 49). La frazione assorbita è metabolizzata nel fegato attraverso processi piuttosto complessi (Figura 1).

Il benzene assorbito è trasformato da una ossidasi microsomiale (il sistema citocromo P-450 II E) in benzene ossido, che si trova in equilibrio con l'ossepina; questo composto è un intermedio molto reattivo, che può attaccare direttamente i costituenti cellulari (DNA e proteine). Il benzene epossido è uno dei metaboliti del benzene con effetti mielotossici (51).

Il benzene epossido, attraverso una via non enzimatica, va incontro a un riarrangiamento spontaneo con formazione di fenolo; l'idrossilazione del fenolo provoca poi la formazione dell'idrochinone e del catecolo, quest'ultimo si forma anche da una serie di reazioni che hanno come punto di partenza l'idratazione dell'ossido di benzene in benzene diidrodiole, il quale viene successivamente ossidato da una deidrogenasi (41).

I principali metaboliti urinari del benzene sono quelli fenolici (fenolo, catecolo, chinolo, 1,2,4-benzotriolo) e i suoi solfo- e glucurono- coniugati (Figura 2). Infatti il fenolo, l'idrochinone, il catecolo, e il suo prodotto di idrossilazione, l'1,2,4-triidrossibenzene, possono combinarsi con l'acido glucuronico o con il solfato: i glucurono-coniugati e i solfo-coniugati sono escreti attraverso le urine.

Il fenolo urinario è stato usato per molto tempo come bioindicatore di esposizione al benzene, e sebbene i principali metaboliti urinari del benzene siano proprio il fenolo e i suoi coniugati, queste sostanze non sono bioindicatori specifici perché l'esposizione al benzene, al di sotto di 5 ppm, non può essere rivelata, a causa dell'elevato livello di fondo generato da altre numerosi fonti di fenolo (endogene, alimentari e ambientali) (3, 4, 52-59).

Un'ulteriore via di biotrasformazione porta la formazione dell'acido *trans,trans*-muconico (t,t-MA) (Figura 3) a partire dalla scissione del benzene glicol, o dalla rottura dell'anello aromatico (presumibilmente sempre a livello epossidico) formando la *trans,trans*-muconaldeide, poi ulteriormente ossidata ad acido t,t-MA. Questa nuova via metabolica è stata individuata nel 1986 (60) e il suo prodotto di biotrasformazione finale è stato proposto come indicatore biologico di esposizione umana a benzene a partire dal 1989 (61) e incluso come

indicatore fra gli indici della DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), commissione investigativa tedesca per la valutazione dei rischi chimici in ambienti di lavoro.

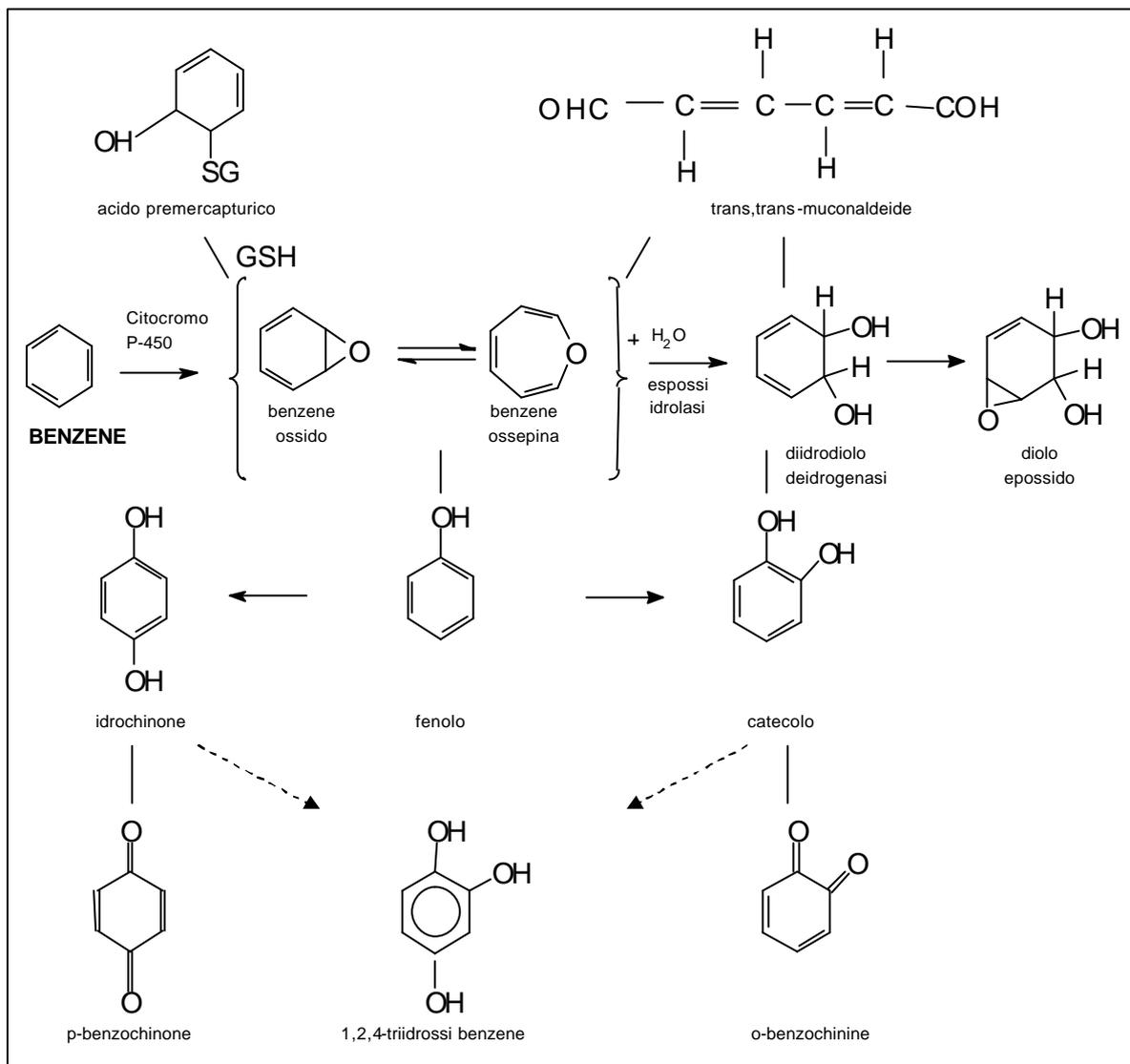


Figura 1. Schema del metabolismo del benzene

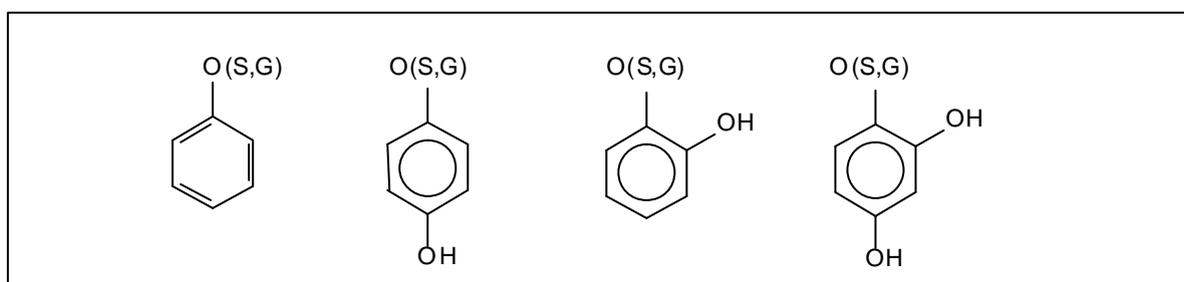
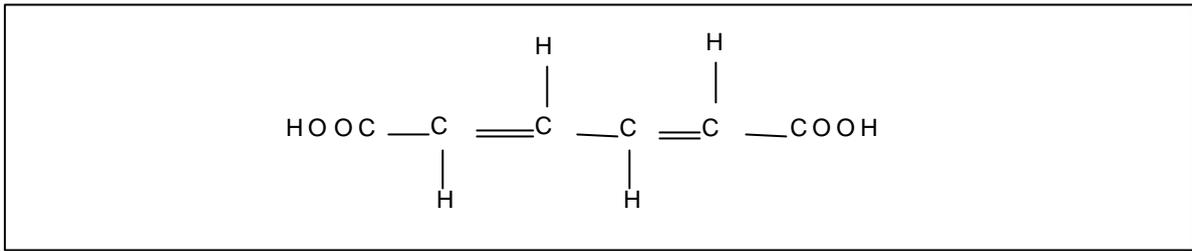


Figura 2. Solfo- e glucurono- composti del fenolo



**Figura 3. Acido *trans,trans*-muconico**

Il t,t-MA, che sembrava essere piuttosto specifico (62) e avrebbe potuto essere utile nel valutare esposizioni a concentrazioni inferiori a 5 ppm, risente, invece, dell'effetto da coesposizione al toluene (52, 58, 61-64). Inoltre è stato recentemente segnalato che il metabolismo dell'acido sorbico contribuisce alla concentrazione di t,t-MA urinario. L'acido sorbico è un conservante e fungistatico diffusamente usato nelle industrie alimentari, cosmetiche, farmaceutiche (65-67). È stato osservato che, nel caso di non fumatori, il 5-25% del t,t-MA urinario proviene dall'assunzione di alimenti contenenti acido sorbico, per i fumatori questo valore è compreso tra il 10-50% poiché si aggiunge il t,t-MA derivante dal metabolismo del benzene assunto attraverso il fumo di tabacco (66, 67).

L'epossido del benzene può inoltre reagire con il glutatione per produrre lo S1 glutatione, l'azione successiva della glutationasi, in presenza di un accettore glutammina, la peptidasi e l'acetil CoA acetiltransferasi, porta alla formazione di acido premercapturico, cioè S1 acetil-L-cisteina, che è successivamente escreto come acido S-PMA (41). Numerosi studi su cavie hanno dimostrato che questo metabolita, in seguito all'esposizione a benzene, è escreto con una buona relazione dose-risposta (67-69).

L'individuazione dell'acido S-PMA quale prodotto di biotrasformazione del benzene è del 1953 (71). Successivamente, fu dimostrato che incubando glutatione con citoplasma epatico, in presenza di benzene-epossido, si ha la formazione dell'S-PMA (72).

L'acido S-PMA è un indicatore biologico specifico di esposizione a benzene (3), e in questo, superiore al t,t-MA, poiché non sono state finora identificate sorgenti diverse dal benzene che contribuiscano all'escrezione urinaria dell'S-PMA.

Riepilogando, questo metabolita soddisfa entrambe le caratteristiche di un buon bioindicatore: la specificità e la sensibilità (3, 4, 53, 72).

La formazione di S-PMA, solfati e glucuronidi è generalmente considerata una via detossificante che porta all'escrezione dei metaboliti del benzene con l'urina, mentre tutte le altre vie metaboliche producono metaboliti potenzialmente tossici (41).

Alcuni studi di laboratorio hanno verificato che, in media, il 12,1% (3,8-27,8%) del benzene totale inalato viene eliminato dai polmoni attraverso l'aria espirata, mentre il 33% circa viene escreto attraverso le urine, principalmente sotto forma di fenoli coniugati, che rappresentano, circa, il 23,5% del benzene assorbito, sotto forma di catecolo (2,2%) e idrochinone (4,8%). L'acido muconico, invece, rappresenta l'1,3% del benzene inalato e l'acido S-fenilmercapturico lo 0,5%. Una piccola quota (0,1-0,2%) di benzene viene escreto immodificato nelle urine (41). Boogard e van Sittert (69) hanno stimato valori medi di 3,9% (1,9-7,3%) per il t,t-MA e 0,11% (0,05-0,26%) per il metabolita S-PMA.

L'escrezione dei metaboliti è generalmente completa entro le 24-48 ore successive a una singola esposizione, ciò comporta una emivita biologica inferiore alle 12 ore (41), valutata da Boogard e van Sittert (69) in un intervallo di 9,1-3,7 ore per il metabolita S-PMA e di 5,0-2,3 ore per il t,t-MA.

Per quanto riguarda i limiti per gli indicatori di esposizione a benzene (Biological Exposure Indices-American Conference of Governmental Industrial Hygienist, BEI-ACGIH), fino al 1996 gli indicatori biologici proposti erano il fenolo urinario (con un limite di 50 mg/g creatinina) in campioni raccolti a fine turno, e il benzene tal quale nell'aria alveolare o nell'aria espirata media (con limiti, rispettivamente, di 0,08 e 0,12 ppm in campioni biologici raccolti a distanza dall'esposizione, cioè all'inizio del turno successivo) (73). Dal 1997 in poi, questi indicatori biologici sono stati eliminati dalle liste dei BEI-ACGIH, e al loro posto è stato introdotto dall'acido S-PMA urinario con un limite di 25 µg/g creatinina, per un'esposizione al benzene di 0,5 ppm (TLV-TWA) (2).

Anche la commissione investigativa tedesca per la valutazione dei rischi chimici in ambienti di lavoro, il DFG include tra gli indicatori biologici del benzene il metabolita urinario S-PMA, con il t,t-MA e il benzene ematico, anche se non propone per il benzene, come per altre sostanze cancerogene, alcun limite ambientale (MAK) o biologico (BAT) ma solo limiti tecnici (TRK) o limiti equivalenti (EKA) per gli esposti per motivi professionali. Il limite equivalente (EKA) proposto per l'S-PMA è di 45 µg/g creatinina per una esposizione al benzene di 1 ppm (74).

## Determinazione dell'acido S-PMA

I metodi attualmente sviluppati per la determinazione di tale metabolita, si basano su analisi gas-cromatografiche caratterizzate da limiti di rivelabilità molto bassi (1-5µg/l), ma caratterizzate da laboriose procedure di derivatizzazione (4, 55, 59, 69).

Jongeneelen *et al.* (75) furono i primi a descrivere un metodo basato su una determinazione dell'S-PMA mediante HPLC-UV (High-Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet) (256 nm), tuttavia, i cromatogrammi HPLC-UV di estratti urinari, specialmente in soggetti fumatori, contengono diverse sostanze che coeluiscono in prossimità dell'analita e che possono, quindi, interferire con l'esatta misura del composto in esame (76).

Altre determinazioni dell'S-PMA, mediante HPLC, hanno sfruttato la fluorescenza come tecnica di rivelazione, raggiungendo anche in questo caso limiti di rivelabilità molto bassi, non riuscendo tuttavia a semplificare le procedure di derivatizzazione (3, 56, 58, 72).

È stato infine recentemente messo a punto metodo per la determinazione dell'S-PMA basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa che utilizza una sorgente elettrospray e un analizzatore a triplo quadrupolo: LC-ES-MS/MS (76).

# CROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA

Generalmente, gli spettrometri di massa, per analisi di composti organici, possono essere abbinati sia a gas cromatografi (GC-MS) che a cromatografi liquidi (LC-MS); quest'ultimo caso assume un'importanza notevole nel momento in cui si debbano analizzare campioni che contengano componenti non volatili o polari.

Durante lo sviluppo di questa tecnica accoppiata, sono stati affrontati tre problemi di compatibilità: quello tra i grandi volumi di solvente in uscita dalla colonna e la necessità di operare in vuoto proprio della spettrometria di massa, le limitazioni nella composizione della fase mobile e la natura degli analiti.

Lo sviluppo della LC-MS comporta notevoli vantaggi: la possibilità di effettuare analisi di composti non volatili oppure termolabili, evitando lunghi e a volte complessi processi di derivatizzazione, la capacità di arrivare a limiti bassi di rilevabilità e infine la possibilità di determinare qualunque tipo di analita, in considerazione del fatto che lo spettrometro di massa è un rivelatore universale.

Negli ultimi 20 anni, sono stati sviluppati numerosi tipi di interfaccia in modo da minimizzare l'incompatibilità tra spettrometro e cromatografo liquido dovuta, come già detto, agli elevati volumi di solvente, provenienti dal HPLC, che entrano nella sorgente ionica. In questo periodo, sono state sviluppate anche nuove strategie di ionizzazione che hanno contribuito all'evoluzione di questa tecnica.

Nell'interfacciamento LC-MS il flusso della fase mobile gioca un ruolo molto importante, infatti, molte interfacce possono lavorare in un ristretto intervallo di flusso. Nel corso dello sviluppo di varie interfacce LC-MS, è stata presa in considerazione la miniaturizzazione delle colonne cromatografiche in modo da evitare splittaggi di solvente per la riduzione della velocità di flusso.

Conformemente alla teoria cromatografica, la concentrazione massima ( $C_{max}$ ) di un analita all'apice del picco cromatografico può essere descritta come funzione di un certo numero di parametri cromatografici: la massa iniettata  $M$ , il numero di piatti  $N$ , la lunghezza  $L$ , il diametro interno  $d_c$ , e la porosità e della fase stazionaria della colonna:

$$C_{max} = 4M (N)^{1/2} \times [d_c^2 p e L (1+k') (2 p)^{1/2}]^{-1}$$

dove  $k'$  rappresenta il rapporto di capacità dell'analita e la massa iniettata  $M$  è il prodotto della concentrazione del campione  $C_0$  per il volume iniettato  $V_{in}$ .

Da questa equazione si può notare come, confrontando due colonne con caratteristiche identiche, ma con differente diametro interno, l'iniezione della stessa massa produrrà una concentrazione maggiore nel caso della colonna con diametro interno minore. Ciò comporta, a parità di sensibilità strumentale, un limite di rilevabilità più basso.

Per questo motivo, la tendenza attuale nello sviluppo di una metodica mediante LC-MS comporta l'utilizzo di colonne con diametro interno ridotto (<4,6 mm) e conseguentemente di pompe a bassi flussi (77).

## Interfacce LC-MS

Il problema principale affrontato nell'accoppiare lo spettrometro di massa al cromatografo liquido è rappresentato dal fatto che il campione è estremamente diluito nel liquido di trasporto, per questo motivo si sono dovuti sviluppare dei metodi che consentissero di rimuovere il

solvente prima di introdurre il campione nello spettrometro. Di seguito verranno presentati brevemente i diversi tipi di interfacce, sviluppate nel tempo, con i relativi vantaggi e/o svantaggi inerenti al loro utilizzo.

Uno dei primi sistemi di interfacciamento è costituito da un'interfaccia a cintura mobile (*moving belt*), essenzialmente composta da un nastro ininterrotto che trasporta l'effluente dal HPLC alla sorgente ionica. Durante il trasporto la fase mobile viene eliminata dall'innalzamento della temperatura e nella sorgente l'analita viene desorbito termicamente; l'analita si trova quindi in stato gassoso e per permettere la formazione degli ioni è successivamente sottoposto a impatto elettronico oppure a ionizzazione chimica. Questo meccanismo, uno dei primi durante l'evoluzione delle tecniche di interfacciamento, è stato considerato piuttosto complesso e quindi del tutto sostituito da un'interfaccia a fascio di particelle.

Nel caso dell'interfaccia a fascio di particelle (*particle beam*), l'eluente della colonna viene nebulizzato pneumaticamente o termicamente in una camera di desolvatazione in cui la pressione è vicina a quella atmosferica. Questa camera è connessa a un "separatore inerziale", grazie al quale gli analiti ad alta massa vengono trasferiti nello spettrometro, mentre le molecole di solvente (a più bassa massa) sono efficientemente pompate via. Le molecole di analita sono poi trasferite in una sorgente di ioni a impatto elettronico o a ionizzazione chimica. Sebbene gli spettri generati dall'impatto elettronico siano facilmente interpretabili, questo tipo di interfaccia è stato attualmente sostituito da tecniche più efficienti e di più semplice utilizzo.

Un altro tipo di interfaccia, ancora oggi utilizzata, è quella a flusso continuo o a bombardamento di atomi (*continuous flow or fast-atom bombardment*); in questo caso l'eluente, con una bassa velocità di flusso (5-15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), viene miscelato con un solvente appropriato (es. glicerolo), fatto passare attraverso un ago capillare costituito da silice fusa e, successivamente, attraversa un *frit* d'acciaio; a questo punto si verifica un equilibrio tra l'evaporazione del solvente e la formazione di uno spray pressoché uniforme. La formazione di ioni avviene grazie al bombardamento dello spray da parte di atomi o ioni molto veloci. Il campo di applicazione di questa interfaccia riguarda molecole essenzialmente polari e molto labili, in questo campo l'elettrospray rappresenta una valida alternativa.

Un'altra variante nell'interfacciamento tra HPLC e spettrometro di massa è rappresentata dall'introduzione diretta (*direct liquid introduction*) dell'eluente attraverso un piccolo diaframma, che provoca la nebulizzazione in una camera di desolvatazione a pressione ridotta, connessa alla sorgente di ionizzazione chimica. Poiché i flussi ammessi per questa tecnica sono limitati e poiché è frequente l'otturazione del diaframma, l'introduzione diretta della soluzione è scomparsa ed è stata completamente sostituita dall'interfaccia termospray.

L'interfaccia termospray, attraverso un tubo vaporizzatore riscaldato, genera un getto di vapore e minuscole gocce (il cosiddetto spray); la desolvatazione delle gocce contenenti solvente e analita è assistita da calore in una regione a bassa pressione; in seguito l'analita viene ionizzato grazie a un processo di evaporazione, ma soprattutto mediante ionizzazione chimica. Questa tecnica è stata ampiamente usata nei sistemi combinati di cromatografia liquida con spettrometria di massa, tuttavia, sebbene fornisca utili informazioni riguardanti le masse molecolari, spesso offre limitate indicazioni strutturali di frammentazione.

Una valida alternativa è costituita dall'interfaccia elettrospray, che fornisce migliori risultati in termini di limite di rilevabilità e di semplicità interpretativa degli spettri di massa.

Una interfaccia diffusamente impiegata è quella a ionizzazione chimica a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI); in questo caso, l'eluente proveniente dalla colonna cromatografica passa attraverso un ago nebulizzatore, creando un finissimo spray, che viene in seguito convogliato in un capillare riscaldato dove le gocce dell'eluente sono vaporizzate. La risultante miscela gas/vapore passa attraverso un ago a corona cui è applicato un potenziale e dove avviene la ionizzazione che crea ioni gassosi altamente

reagenti. Questi ultimi ionizzano il campione attraverso la ionizzazione chimica. Il suddetto processo avviene in una camera spray che si trova a pressione atmosferica. Gli ioni così prodotti vengono introdotti nello spettrometro attraverso un capillare di vetro, che insieme a una serie di lenti e *skimmer*, convogliano gli ioni nell'analizzatore. Generalmente risultati ottimali si ottengono con molecole apolari.

Un sistema di interfacciamento molto utilizzato è l'interfaccia elettrospray (Atmospheric Pressure Ionization Electro Spray, API-ES), utilizzata per analisi di composti polari o molto polari e per macro molecole biologiche, che in genere sono difficilmente ionizzabili e vaporizzabili; è molto diffusa perché efficiente, di semplice utilizzo e robusta. Il meccanismo di funzionamento sarà approfondito in seguito, poiché lo strumento utilizzato per lo sviluppo del metodo analitico riguardante la determinazione dell'S-PMA, come bioindicatore di esposizione urinario del benzene, è equipaggiato proprio con tale tipo di interfaccia (77).

## Analizzatori di massa

Esistono diversi tipi di analizzatori di massa che vengono utilizzati nella tecnica accoppiata, cromatografia liquida e spettrometria di massa. Il compito principale dell'analizzatore di massa è quello di separare gli ioni con rapporto massa/carica differenti, distinguendo anche differenze minime di massa (questa capacità è esprimibile mediante la risoluzione  $R = m/\Delta m$ ) e consentendo il passaggio di un numero di ioni sufficiente a fornire correnti ioniche misurabili. Di seguito verranno presentate brevemente le caratteristiche degli analizzatori che attualmente vengono generalmente impiegati nel LC-MS.

Un analizzatore utilizzato è quello a settore magnetico, che impiega un magnete permanente o un elettromagnete per deviare il fascio di ioni proveniente dalla sorgente lungo una traiettoria circolare. Gli ioni, generati per impatto elettronico, vengono accelerati attraverso una fenditura e possono essere selezionati alla fenditura di uscita variando l'intensità del campo magnetico oppure il potenziale di accelerazione. Gli ioni emergenti dalla fenditura di uscita incidono su un elettrodo collettore, producendo una corrente ionica che viene amplificata e registrata. Ci sono analizzatori magnetici a singolo fuoco, caratterizzati da traiettorie circolari di 180°, 90° o 50°, in cui la separazione avviene approssimando che tutti gli ioni aventi la stessa carica acquistino la stessa energia cinetica in seguito all'accelerazione, indipendentemente dalla loro massa, e che quindi ioni più pesanti possano percorrere il settore magnetico a velocità inferiori. Quelli a doppio fuoco, rettificano l'approssimazione fatta sull'energia cinetica per il singolo fuoco, utilizzando un analizzatore elettrostatico aggiuntivo, che separa le particelle con differenti energie cinetiche. Gli spettrometri di massa magnetici sono caratterizzati da ottime risoluzioni, ma anche da costi onerosi.

Nello spettrometro di massa a quadrupolo il cuore dello strumento è costituito da quattro barre metalliche cilindriche, che funzionano da elettrodi. Gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accelerati da un potenziale e immessi nello spazio tra le barre. Le barre opposte sono collegate elettricamente tra loro, una coppia al polo positivo di un generatore variabile in corrente continua e l'altra coppia al polo negativo; inoltre a ogni coppia è applicato un potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza, con uno sfasamento di 180°. I potenziali in corrente continua e alternata svolgono un ruolo decisivo sulle traiettorie degli ioni che percorrono il canale tra le barre.

Affinché uno ione attraversi il quadrupolo fino al rivelatore, è necessario che abbia una traiettoria stabile all'interno della cavità tra le quattro barre, altrimenti la sua carica verrà neutralizzata, colpendo le barre, e la molecola risultante verrà trasportata via. Che uno ione

colpisca o meno una delle barre dipende dalla velocità di traslazione, dal rapporto massa/carica e dalla frequenza e valore del potenziale in corrente alternata.

L'effetto totale del quadrupolo è quello di trasmettere gli ioni con un limitato intervallo di valori  $m/z$ ; il centro della banda trasmessa può essere variato regolando i potenziali in corrente continua e alternata.

Lo spettrometro generalmente più usato è proprio quello equipaggiato con il quadrupolo, poiché questi è semplice da usare, relativamente economico e facilmente applicabile in combinazione con la cromatografia. Inoltre consente una risoluzione di una unità di massa, una buona capacità di effettuare la quantificazione e fornisce una semplice introduzione del campione grazie a condizioni di vuoto non troppo severe. Una limitazione di questo analizzatore sta nel fatto che può operare in un intervallo di massa piuttosto ristretto: da 1 a 2000 unità di massa atomica e in alcuni casi fino a 4000 unità di massa atomica.

Nello spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QQQ) il campione viene introdotto in una sorgente di ionizzazione, gli ioni così prodotti vengono accelerati in un primo quadrupolo, dove avviene la separazione degli ioni progenitori, questi vengono inviati nel secondo quadrupolo costituito da una camera a collisione, che viene fatta funzionare solo a radiofrequenza (cioè senza applicare alle barre un potenziale continuo), nella quale si produce una ulteriore ionizzazione (a carico di molecole di elio presenti in questa regione) degli ioni progenitori provenienti dal primo quadrupolo; questa combinazione produce un metodo efficace di focalizzazione degli ioni. Infine gli ioni figlio prodotti passano attraverso il terzo quadrupolo, dove viene registrato lo spettro di massa.

Il triplo quadrupolo è un dispositivo molto efficiente, infatti consente di fornire informazioni sulla struttura molecolare grazie all'impiego della massa/massa (cioè della frammentazione), oltre a precise assegnazioni di massa e a determinazioni dei pesi molecolari dei composti.

Nell'analizzatore a tempo di volo (Time Of Flight, TOF) vengono prodotti impulsi di ioni positivi in seguito al bombardamento del campione con brevi impulsi di elettroni, ioni secondari o fotoni laser. Gli ioni così prodotti vengono accelerati da un campo elettrico, pulsato alla stessa frequenza delle particelle ionizzanti, ma con fase opposta, e inviati a un "tubo di deriva" lungo circa un metro in cui il campo è nullo. Poiché tutti gli ioni che percorrono il tubo hanno formalmente la stessa energia cinetica, le loro velocità sono inversamente proporzionali alle masse, quindi le particelle più leggere raggiungono il rivelatore prima di quelle più pesanti.

L'acquisizione dei dati risulta essere molto veloce, essendo i tempi di volo di pochi microsecondi. Dal punto di vista della risoluzione e della riproducibilità il TOF è meno soddisfacente del quadrupolo, tuttavia offre molti vantaggi che in parte compensano queste limitazioni: la semplicità, la robustezza, e l'intervallo di masse pressoché illimitato. Il TOF, però, non offre alcuna informazione strutturale perché non effettua la massa/massa, per questo motivo è generalmente accoppiato a una trappola ionica.

La trappola ionica è un dispositivo costituito da un elettrodo centrale e da una coppia di elettrodi a calotta: all'elettrodo centrale viene applicato un potenziale a radiofrequenza, che provoca la stabilizzazione delle orbite degli ioni con un determinato intervallo di rapporti massa/carica, in uno spazio delimitato dell'analizzatore. Il potenziale a radiofrequenza viene fatto variare in modo da destabilizzare le masse interferenti, mentre quelle di interesse vengono in tal modo isolate e, per collisione con un gas inerte (generalmente elio) vengono frammentate. Informazioni strutturali più approfondite e il meccanismo di funzionamento saranno esaminati in seguito.

Sebbene la maggioranza delle applicazioni analitiche, mediante LC-MS, venga attualmente eseguita essenzialmente usando un sistema a ionizzazione atmosferica tramite una sorgente elettrospray, e come analizzatore un singolo o un triplo quadrupolo, l'impiego invece di una trappola ionica comporta una migliore sensibilità e una maggiore velocità di scansione. L'incremento di sensibilità, infatti, è dovuto al fenomeno di accumulo degli ioni, mentre

l'elevata velocità di scansione dipende dalle caratteristiche strutturali del dispositivo. Infatti, la trappola ionica è un analizzatore nel tempo (e non nello spazio come il quadrupolo), che possedendo una geometria non lineare, permette scansioni non lineari, che cioè variano esponenzialmente nel tempo e quindi molto velocemente (in un intervallo di millisecondi). Ciò comporta una buona riproducibilità dell'analizzatore, che di conseguenza permette, con buoni risultati, anche analisi quantitative, oltre ad efficaci assegnazioni di massa e di struttura (78, 79).

## Strumentazione usata

La determinazione dell'S-PMA effettuata in questo studio è stata permessa grazie all'utilizzo di uno spettrometro di massa con interfaccia elettrospray e con analizzatore a trappola ionica, accoppiato a un cromatografo liquido. Tale apparecchiatura è prodotta dalla Bruker Daltonics in collaborazione con Agilent ed è nota commercialmente con il nome di Esquire LC-MS.

L'Esquire è costituito da quattro zone: un'interfaccia a pressione atmosferica; una regione di trasporto e focalizzazione degli ioni prodotti nell'interfaccia; la trappola ionica (analizzatore); il detector (dinodo e l'elettromoltiplicatore) che rivelano il segnale (Figura 4).

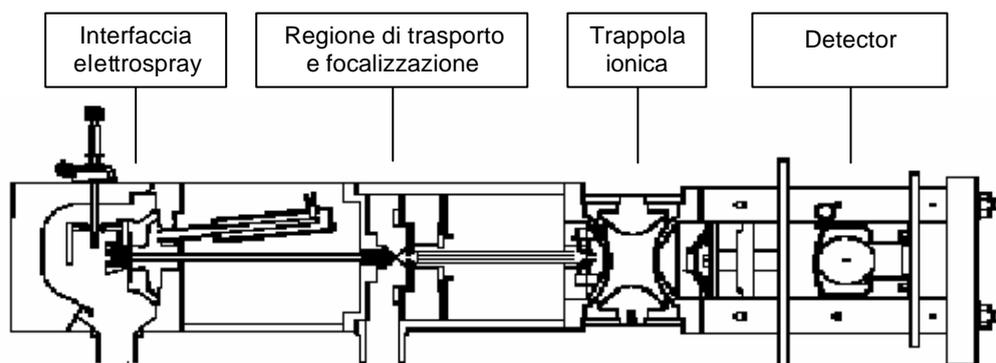


Figura 4. Schema generale dell'Esquire LC e dell'interfaccia API

Queste zone hanno le seguenti funzioni:

1. *Interfaccia elettrospray a pressione atmosferica*

Collega un HPLC allo spettrometro di massa.

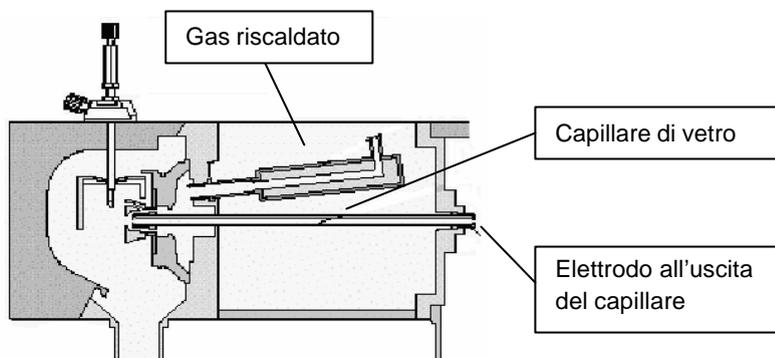
Il compito dell'interfaccia è quello di generare, focalizzare e trasportare gli ioni nell'analizzatore di massa chiamato trappola ionica; l'interfaccia è costituita da tre sezioni:

1. nebulizzatore;
2. camera spray;
3. regione di focalizzazione e trasporto ionico.

Le prime due parti si trovano a pressione atmosferica, mentre l'ultima si trova nella regione in cui è creato il vuoto.

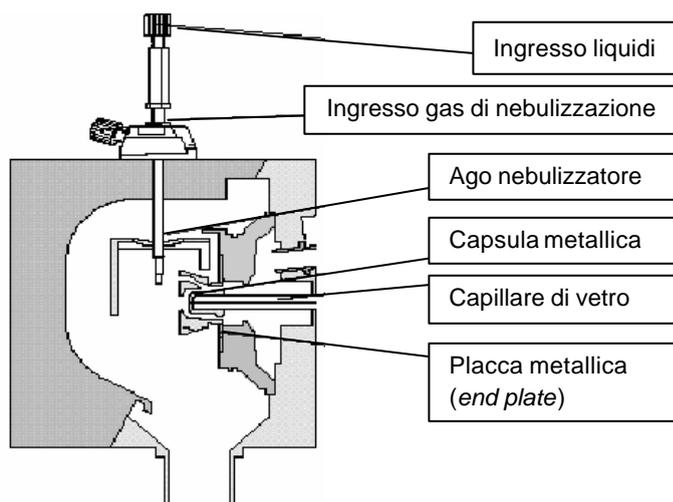
La soluzione contenente il campione e il solvente viene introdotta attraverso un ago nebulizzatore nella camera spray (Figura 5), l'ago è molto fine e risiede all'interno di un tubo coassiale nel quale passa un gas nebulizzante (in questo caso azoto) che è

indispensabile per una corretta formazione dello spray e conseguentemente per una buona corrente stazionaria. Questo gas riscalda il capillare e ha la funzione principale di far evaporare il solvente, senza decomporre termicamente l'analita, infatti, la desolvatazione richiede una gran quantità d'energia, ed è per questo che la temperatura delle gocce e dell'analita rimane piuttosto bassa.



**Figura 5. Sorgente elettrospray e capillare**

Una volta che la soluzione è stata introdotta nella camera spray, un flusso di gas riscaldato (azoto) provvede alla desolvatazione e all'evaporazione del solvente; comunque le gocce sono soggette anche a un gradiente elettrostatico ad elevato voltaggio, il quale assiste alla produzione di gocce di ioni, questi ultimi vengono guidati verso un capillare di vetro ortogonale rispetto all'ago nebulizzatore: questa particolare geometria permette soltanto agli ioni di passare nel capillare perché sono attratti elettrostaticamente da un disco metallico (*end plate*) che è centrato intorno al capillare, quest'ultimo è ricoperto da un guscio metallico e da un collare che si trovano allo stesso potenziale dell'*end plate*. L'ortogonalità tra capillare e nebulizzatore permettono anche alla trappola e all'interfaccia di rimanere puliti e di ridurre il rumore di fondo (Figura 6).



**Figura 6. Camera spray**

## 2. Regione di trasporto e focalizzazione degli ioni

È nella zona del vuoto. Questa regione ha quattro distinti stadi di vuoto stabiliti dalle pompe dell'Esquire LC (una pompa rotativa e due turbomolecolari); queste creano un flusso di ioni dalla camera spray, che è a pressione atmosferica, verso il vuoto dello spettrometro di massa, inoltre rimuovono il gas desolvante e le molecole di solvente; difatti la maggior parte del solvente è eliminato nella camera spray, grazie all'ortogonalità tra ago e capillare.

Questa regione è costituita da:

1. capillare;
2. *skimmer*, ottapoli e lenti.

Il capillare di vetro ha due funzioni principali, quella di trasferire gli ioni dalla camera spray a pressione atmosferica verso la regione del vuoto dello spettrometro di massa, e funziona come barriera di separazione tra la regione della sorgente a pressione atmosferica e la regione del vuoto (Figura 7).

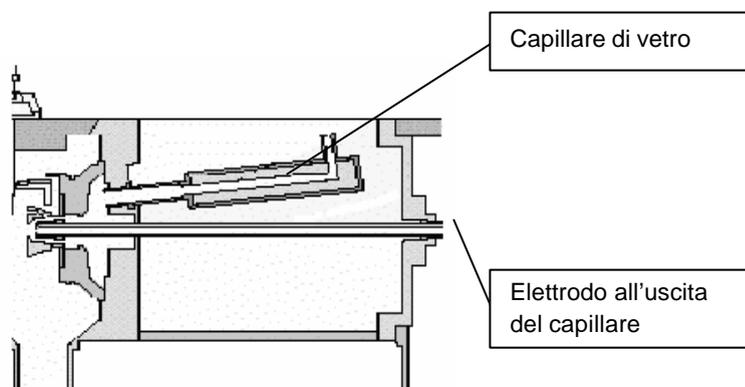
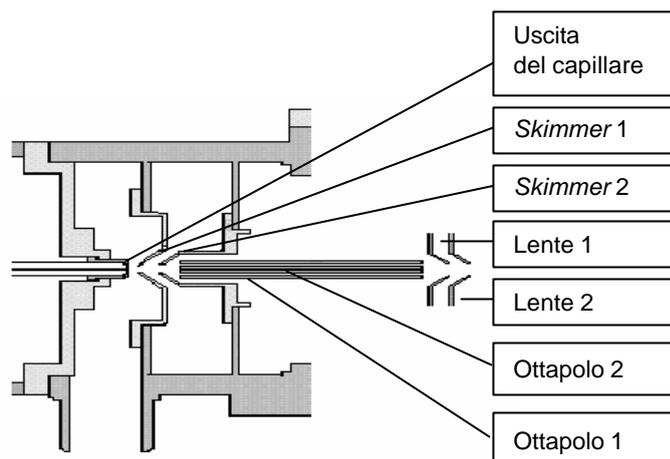


Figura 7. Capillare di vetro

Le parti finali e iniziali del capillare sono metalliche e nella modalità positiva, l'entrata del capillare è a  $-(2-5)$  kV rispetto all'ago e a  $-500$  V all'elettrodo cilindrico. Il gradiente elettrostatico creato da questi voltaggi provoca la produzione di gocce cariche e le aiuta a migrare verso l'entrata del capillare. Una volta vicino all'entrata, gli ioni dell'analita sono spinti nel capillare dal gradiente di pressione tra la camera spray ( $\sim 1013$  mbar =  $760$  torr  $\sim 1$  atm) e il primo stadio di vuoto ( $1$  mbar- $2$  mbar). La fine del capillare è regolata a  $\sim(80-280)$  V dal software, quando gli ioni dell'analita escono dal capillare sono spinti elettrostaticamente verso il primo *skimmer* che è a voltaggio più basso; a causa delle dimensioni del capillare e del gradiente di pressione, gli ioni emergono dalla fine del capillare a una velocità elevatissima. Gli *skimmer*, gli ottapoli e le lenti (Figura 8) hanno la funzione di concentrare e focalizzare gli ioni dell'analita. I voltaggi stabiliti per questi componenti ottici determinano l'efficienza del trasporto ionico e il livello del rumore.



**Figura 8. Elementi della guida ionica**

Quando la trappola sta accumulando ioni, i valori di questi componenti sono disposti per massimizzare la trasmissione ionica, mentre quando la trappola sta effettuando la MS o la MS/MS, i voltaggi sono fissati per bloccare la trasmissione degli ioni in trappola.

### 3. *Trappola ionica (analizzatore)*

È costituita da:

1. due elettrodi a calotta che possiedono piccoli fori che permettono agli ioni di entrare e uscire dalla trappola;
2. un elettrodo ad anello.

### 4. *Detector*

I suoi componenti sono:

1. dinodo;
2. moltiplicatore.

Gli ioni espulsi dalla trappola ionica vengono elettrostaticamente attratti dal rivelatore, che generando una corrente elettrica è in grado di produrre uno spettro di massa.

## **Stadi di lavoro della sorgente elettrospray**

La sorgente elettrospray lavora attraverso tre stadi principali:

1. formazione degli ioni;
2. nebulizzazione;
3. desolvatazione;
4. evaporazione degli ioni.

## Formazione di ioni

Se la chimica dell'analita lo permette, gli ioni si possono generare in soluzione prima della nebulizzazione, ciò ovviamente consente una elevata abbondanza ionica e una buona sensibilità. Gli analiti che non si ionizzano in soluzione possono essere analizzati ugualmente, infatti i processi di nebulizzazione, evaporazione e desolvatazione creano un numero elevato di cariche elettriche sulla superficie della goccia. A seconda delle caratteristiche dell'analita si può adottare la polarità positiva o negativa d'analisi. I composti organici con caratteristiche basiche generalmente sono analizzati in positivo, mentre quelli acidi in negativo; quelle molecole che per loro natura si dissociano poco o per nulla, e che non si protonano in un forte campo elettrico, possono essere ionizzate attraverso la formazione di addotti, a questo scopo vengono utilizzati tamponi come l'acetato di sodio o potassio. Altri tamponi, come l'acetato o il formiato di ammonio, sono utilizzati invece per evitare la formazione di addotti tra l'analita e il sodio o il potassio derivanti da sorgenti endogene.

## Nebulizzazione

La soluzione proveniente dal HPLC è introdotta nella camera spray, che si trova a pressione atmosferica, tramite un sistema di tubi coassiali (il cosiddetto ago nebulizzatore): il tubo più interno è usato per introdurre l'effluente, mentre quello esterno fa passare un gas inerte (azoto) che assiste alla nebulizzazione (Figura 9).

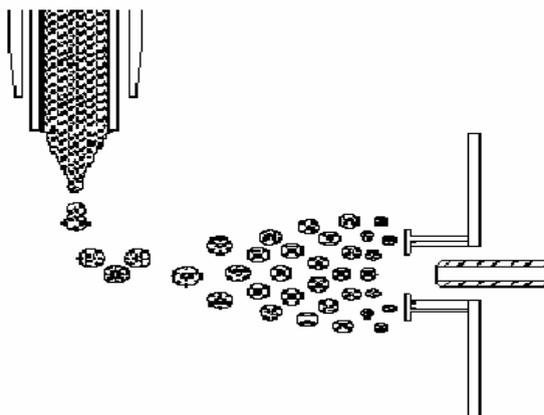


Figura 9. Formazione delle gocce nella camera spray

La combinazione tra l'azione del gas di nebulizzazione e il forte campo elettrico applicato all'*end plate* (placca metallica posta intorno all'entrata del capillare), fa sì che la soluzione si scinda in gocce che tendono a disperdersi. Gli ioni di una certa polarità sono preferenzialmente attratti sulla superficie della goccia dal campo elettrostatico, il risultato finale è che il campione è contemporaneamente caricato e disperso in uno spray fine (chiamato elettrospray) formato da gocce cariche. Queste contengono l'analita, il solvente e ioni negativi e positivi.

## Desolvatazione

La desolvatazione è effettuata mediante un flusso di gas inerte (azoto) riscaldato, in controcorrente rispetto allo spray, che ha il compito di far evaporare il solvente diminuendo così il diametro delle gocce e forzando le cariche a stare più vicine. A questo proposito è importante puntualizzare che la scelta del solvente è fondamentale, il metanolo è il più usato per le sue

caratteristiche chimico fisiche: bassa capacità termica, bassa tensione superficiale e bassa costante dielettrica.

### Evaporazione di ioni

Ci sono varie teorie riguardanti il processo di formazione di ioni, il seguente modello è proposto da Fenn *et al.* (80) ed è tra quelli più generalmente accettati.

Quando il solvente evapora dalle gocce in presenza di un forte campo elettrico, la superficie della goccia diventa altamente carica, ciò comporta un aumento di densità di carica sulla superficie della goccia, la quale si disgrega in microgocce nel momento in cui la densità di carica raggiunge il limite di Rayleigh (Figura 10). Questo processo è reiterativo fino a quando il solo analita viene emesso dalla goccia in fase gassosa.

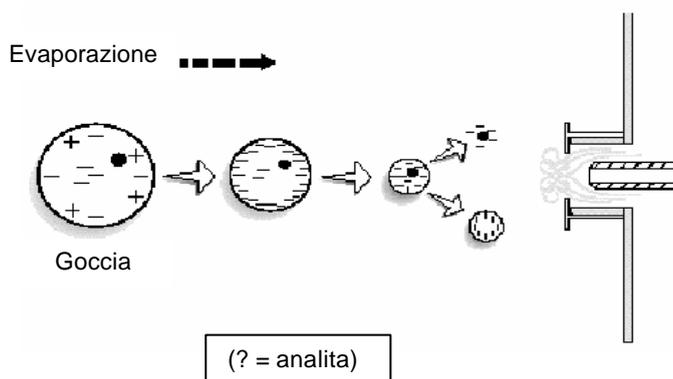


Figura 10. Meccanismo di evaporazione all'interno della camera spray

L'energia di idratazione di un solvente è molto importante, in generale più l'analita è idrofobico (cioè meno idratante) nel solvente, meglio gli ioni possono desorbirsi nella fase gassosa.

### Funzionamento della trappola ionica

Gli ioni generati nell'interfaccia elettrospray, tenderebbero a divergere se non venissero focalizzati nella trappola ionica da una combinazione di lenti elettrostatiche e guide formate da ottapoli.

La trappola ionica è costituita da un elettrodo ad anello, inserito in due elettrodi a calotta, la forma di questi componenti segue un profilo iperbolico tridimensionale (Figura 11). Gli elettrodi a calotta possiedono dei fori attraverso i quali entrano ed escono gli ioni.

All'anello è applicato un potenziale ad elevato voltaggio di radiofrequenza (RF primaria), mentre gli elettrodi a calotta sono tenuti al potenziale di terra; la differenza di potenziale oscillante stabilita tra i due elettrodi e l'anello forma un campo sostanzialmente quadrupolare, per cui a seconda del potenziale oscillante stabilito, il campo può intrappolare gli ioni di una massa definita. In pratica l'intervallo di massa che viene sottoposto a questo campo quadrupolare è abbastanza esteso, e comunque la trappola può effettivamente produrre spettri a piena scansione offrendo quindi alta sensibilità.

Inoltre all'uscita di uno degli elettrodi a calotta è applicato un voltaggio addizionale, una frequenza ausiliaria utilizzata per indurre la risonanza di eccitazione e di espulsione degli ioni,

mentre l'ampiezza della frequenza primaria determina i valori di  $m/z$  che possono essere intrappolati.

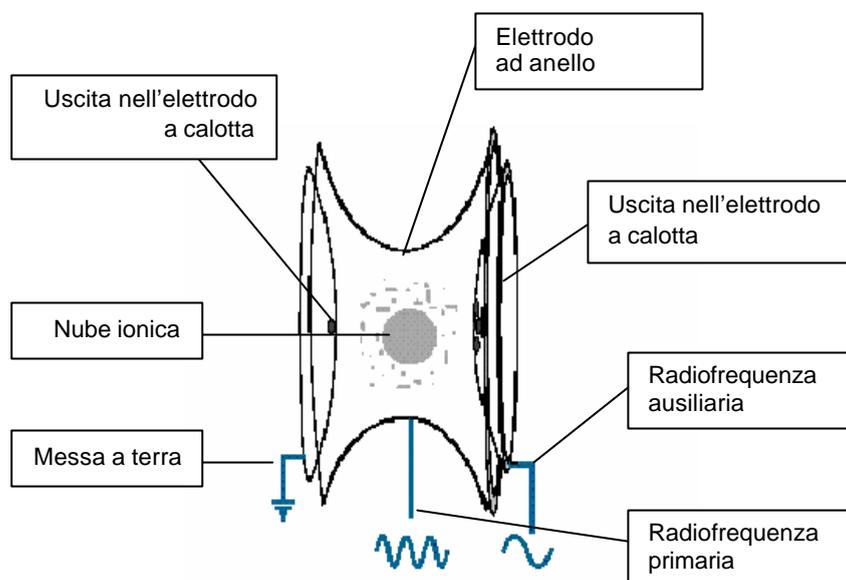


Figura 11. Schema della trappola ionica

Una volta che gli ioni sono entrati nella trappola ionica è necessaria la presenza di un gas di collisione (l'elio), affinché gli ioni dell'analita rimangano all'interno del buca di pseudopotenziale creata dal campo quadrupolare e non fuoriescano immediatamente; l'elio, infatti, incrementa la risoluzione di massa strumentale contraendo le traiettorie degli ioni al centro della trappola e riducendo l'energia cinetica degli ioni.

Gli ioni intrappolati sono soggetti a movimenti sia radiali che assiali; i movimenti di primaria importanza sono quelli assiali nella direzione degli elettrodi a calotta (asse  $z$ ), perché questa è la direzione di introduzione e fuoriuscita degli ioni. Inoltre il campo quadrupolare oltre a produrre la buca pseudopotenziale induce anche un movimento oscillatorio armonico degli ioni la cui componente principale è la frequenza secolare. La frequenza di oscillazione degli ioni è determinata essenzialmente dal rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e dal valore di RF.

L'intervallo di masse di ioni intrappolati simultaneamente nella trappola ionica è descritto dal diagramma di stabilità, che indica quali ioni sono stabili nel campo RF. Il range di massa che può essere contenuto nella trappola possiede un limite: il *cut-off mass*, questo valore può essere determinato dal livello di RF presente sull'anello e può essere descritto come la massa la cui frequenza secolare è metà di quella di RF.

Teoricamente non c'è limite superiore a questo intervallo di massa, ma praticamente ioni con  $m/z$  superiori di 20, 30 volte il valore del *cut-off*, non sono sufficientemente intrappolati dal campo RF.

L'Esquire fa uso di una trappola detta *multipole superimposed*, nella quale il campo quadrupolare riceve contributi da componenti esapolari, ottapolari e di grado superiore; questo effetto è creato variando leggermente l'angolo degli asintoti associati ai profili iperbolici formati dagli elettrodi. Un campo quadrupolare puro mostra un aumento lineare associato al moto degli elettroni, dal centro della trappola verso gli elettrodi ad anello e a calotta.

La presenza di poli a più elevato ordine indica che il campo aumenta più velocemente che linearmente durante il moto degli ioni. Ciò induce risonanze non lineari all'interno del diagramma di stabilità che causano un rapido assorbimento di energia durante il moto.

La risonanza non lineare generata dalla trappola ionica determina un miglioramento di sensibilità e una elevata velocità di scansione rispetto ad altri analizzatori di massa, infatti le scansioni non variano linearmente, ma esponenzialmente nel tempo, quindi molto velocemente.

## La trappola ionica e lo spettro di massa

Le condizioni di risonanza non lineare sono usate per generare lo spettro di massa.

La presenza di un forte accoppiamento tra ioni a carica multipla e la stabilità raggiunta nella fase di chiusura del campo ausiliario e principale producono una precisa risonanza  $m/z$  e provoca l'espulsione accelerata degli ioni.

Quando l'ampiezza del voltaggio RF è progressivamente incrementata, gli ioni con valori successivamente più alti di  $m/z$  vengono espulsi dalla trappola ionica, quindi il detector ionico produce una corrente elettrica che genera uno spettro di massa.

Nello strumento è presente un generatore di RF che emette una frequenza primaria, mentre l'uscita dell'elettrodo a calotta, che si trova in posizione opposta al detector, è connessa con un generatore ausiliario di RF che ha un'ampiezza programmata per ottimizzare le prestazioni dell'analisi.

## Sequenza di scansione

La trappola viene riempita dagli ioni provenienti dalla sorgente, quindi un campo RF intrappola gli ioni utilizzando un'ampiezza quadrupolare debole (riferita alla massa *cut-off*).

Dopo un certo tempo di accumulazione, il voltaggio dello *skimmer 2* è aumentato in modo che gli ioni non entrino più in trappola.

Successivamente gli ioni sono rallentati dalla collisione con l'elio in modo che la nuvola ionica sia posizionata al centro della trappola; durante la scansione i campi quadrupolari e dipolari sono aumentati per espellere gli ioni a  $m/z$  via via maggiori.

Il ciclo si ripete quando la trappola si trova nelle condizioni iniziali e lo *skimmer 2* possiede potenziali tali da permettere l'accumulazione degli ioni.

Le operazioni che si eseguono praticamente, per ottimizzare le condizioni della trappola ionica, si basano sull'ottimizzazione del segnale in profilo, ottenuto per infusione diretta, escludendo il comando ICC (Ion Charge Control, controllo di carica ionica). Quindi si inserisce un tempo di accumulazione (*accumulation time*), tale che il segnale in profilo non si allarghi e non dia uno slittamento della massa verso valori superiori, questi fenomeni indicherebbero una saturazione della trappola ionica. A tale valore di *accumulation time*, corrisponde un valore target reale (*actual target*) che va inserito. Successivamente, si accende l'ICC, che corregge il tempo di accumulazione automaticamente nel corso di un'analisi cromatografica, e si introduce un valore massimo di tempo di accumulazione (*max accumulation time*), che stabilisce un termine massimo durante l'accumulazione.

## MS/MS

Prima che lo ione selezionato venga eccitato, per indurre la dissociazione, è necessario rimuovere tutti gli altri ioni dalla trappola, in modo che dopo la dissociazione siano presenti solo i prodotti dello ione precursore.

I fenomeni che avvengono in trappola sono:

1. *isolamento*;
2. *frammentazione*.

Nella fase strumentale dell'*isolamento*, lo strumento può espellere tutti gli ioni dalla trappola ad eccezione dello ione precursore di interesse. Poiché ogni massa ha la sua risonanza specifica è necessario avere una banda composta da un intervallo di frequenze tali da eccitare e poi espellere un ampio intervallo di massa. Per cui quando si vuole isolare un particolare ione precursore, un sistema elettronico genera uno spettro di frequenze a banda estesa in cui sono presenti tutte le frequenze ad eccezione di quella corrispondente alla risonanza dello ione precursore. Operativamente, si seleziona la massa da isolare e una ampiezza, o meglio un intervallo di massa centrato sulla massa prescelta.

Per indurre la *frammentazione*, l'energia dello ione di interesse è aumentata grazie all'applicazione della risonanza di eccitazione da parte di un campo dipolare. Questa risonanza di eccitazione, a forma d'onda, contiene una piccola banda di frequenze che si trovano al di sopra e al di sotto della frequenza dello ione in esame, in tal modo si aumenta la stabilità di eccitazione e si compensa lo slittamento che si ha a causa del moto degli ioni dovuto a componenti di campo non lineare.

Gli ioni precursori assorbono rapidamente energia dal campo dipolare e cominciano a collidere con l'elio che li dissocia. Gli ioni prodotti dopo la frammentazione sono sottoposti a un potenziale proveniente da un campo quadrupolare, questo è determinato da un livello primario di RF, se il livello primario è troppo alto, allora gli ioni prodotti a bassa massa saranno espulsi dalla trappola, se il livello RF è troppo alto, allora la buca pseudo-potenziale sarà insufficiente per permettere l'eccitazione MS/MS. Il valore tipico di basso *cut-off* è 1/3 dello ione precursore.

In pratica, si opera, dopo avere selezionato una massa da isolare, con una certa ampiezza di finestra centrata sulla massa osservata, immettendo un valore di *cut-off* e variando l'*amplitude*. In generale, applicando la modalità chiamata "fast calculation" durante la procedura di MS/MS, lo strumento dispone automaticamente un valore al *cut-off* pari a circa un terzo della massa dello ione genitore. Se, invece, quest'ultimo frammenta facilmente è possibile abbassare il valore del *cut-off* (escludendo la modalità "fast calculation") in modo da valutare anche ioni con bassa massa.

L'*amplitude* regola invece l'ampiezza della RF applicata nella trappola e che comporta la frammentazione dello ione precursore; bassi valori di questo parametro fanno sì che lo ione genitore rimanga invariato, mentre valori elevati producono ioni figlio, di intensità più o meno elevata a seconda del valore assegnato al parametro suddetto.

## Parametri del *tune* variabili

I parametri strumentali importanti per l'ottimizzazione del segnale si trovano nella sezione *tune* dello strumento e nel *mode*, di seguito vengono chiariti brevemente i significati di tali parametri:

- *Skimmer* 1 e 2  
Convogliano gli ioni che fuoriescono dal capillare di vetro e li guidano attraverso gli ottapoli.  
Range per *Skimmer* 1: (-100÷100)V; e per *Skimmer* 2: (-390÷390)V.

- *Octopole*  
Focalizza e guida gli ioni provenienti dal capillare. Il valore indica la media tra le correnti continue applicate ai due ottapoli.  
Range per *Octopole*: (-80÷80)V.
- *Octopole ?*  
Indica la differenza di corrente continua tra i due ottapoli.  
Range per *Octopole ?*: (-40÷40)V.
- *Octopole RF*  
Stabilisce il valore di radiofrequenza applicato agli ottapoli.  
Range per *Octopole RF*: (0÷300)Vpp.
- *Lens 1 e 2*  
Si trovano alla fine degli ottapoli e guidano gli ioni attraverso i fori di entrata dell'analizzatore.  
Range per *Lens 1* e *Lens 2*: (-360÷360)V.
- *Cap exit offset*  
Indica il voltaggio del capillare applicato rispetto allo *Skimmer 1*.
- *Trap drive*  
Questo valore stabilisce la forza del campo RF applicato alla trappola, mentre gli ioni provenienti dalla sorgente, vengono accumulati nella trappola. Alti valori sono appropriati per ioni a elevato rapporto m/z, viceversa per quelli più bassi.  
Range per *Trap drive* (15÷2200).
- *End plate offset*  
Indica la differenza di voltaggio tra capillare e *end plate* (placca metallica posta intorno all'entrata del capillare).  
Range per *End plate offset* (-4000÷3000)V.
- *Scan resolution* (= risoluzione di scansione) ha tre diverse modalità:
  - *normal*, con un'ampiezza a metà altezza del picco (FWHM) di 0,6 m/z e una velocità di scansione di 13000 m/z/s, per un range di massa (50-2000) m/z;
  - *enhanced*, con una FWHM di 0,4 m/z e una velocità di scansione di 2000 m/z/s, per il range di massa suddetto;
  - *maximum*, con una FWHM di 0,2 m/z e una velocità di scansione di 500 m/z/s, nello stesso range di massa.

Il tipo di risoluzione gioca un ruolo molto importante: la modalità *normal* comporta un'intensità maggiore nel profilo di massa a spese della sua risoluzione. La scelta di una modalità rispetto all'altra dipende dal campione reale, infatti se esiste un interferente che risponde nelle vicinanze dell'analita, allora è necessario incrementare la risoluzione.

# PARTE SPERIMENTALE

## Prodotti chimici

I prodotti chimici utilizzati nella parte sperimentale dello studio sono:

- *Solventi*  
Metanolo e acetonitrile, per HPLC; alcol isopropilico per HPLC; acqua ultrapura, filtrata e deionizzata a 18 MO.
- *Reagenti*  
Acido acetico glaciale RPE; acetato di ammonio.
- *Standard*  
Acido DL-Fenilmercapturico (purezza >98%).
- *Soluzioni*
  - Soluzione acquosa di acido acetico 0,1%  
Sono stati preparati, per pesata, prelevando 0,53 g da una soluzione di acido acetico al 99,8% con densità pari a 1,05 kg/l, 0,5 l di una soluzione acquosa di acido acetico 0,1%.
  - Soluzione di acetato di ammonio  $10 \times 10^3$  mol/l  
Sono stati pesati 0,4157 g di acetato di ammonio, quindi sciolti direttamente nella bottiglia da HPLC in 0,5 l di acqua deionizzata, per ottenere una soluzione dal titolo di  $10,79 \times 10^3$  mol/l.
  - Soluzione madre di S-PMA  
Sono stati pesati 11,468 mg di SPMA su bilancia microanalitica, sono poi stati introdotti in un matraccio di vetro scuro da 100 ml, sciolti e portati a volume in metanolo. La soluzione risultante ha concentrazione: 0,11468 mg/ml = 114,68 µg/ml.
  - Preparazione di soluzioni standard di acido S-PMA:
    - Standard 1: 20 µl di soluzione madre, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 229,36 pg/µl.
    - Standard 2: 5 ml dello standard 1, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 114,68 pg/µl.
    - Standard 3: 2 ml dello standard 2, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 22,94 pg/µl.
    - Standard 4: 5 ml dello standard 3, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 11,47 pg/µl.
    - Standard 5: 5 ml dello standard 4, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 5,73 pg/µl.
    - Standard 6: 2 ml dello standard 4, portati a 10 ml con metanolo, in matraccio tarato. La concentrazione dello standard risulta: 2,29 pg/µl.

- Preparazione delle soluzioni di S-PMA per la valutazione dell'accuratezza:
  - Soluzione 1: a 100  $\mu\text{l}$  di campione trattato di urina si aggiungono 10  $\mu\text{l}$  di standard di S-PMA 114,68 pg/  $\mu\text{l}$ , in metanolo. Il volume totale è di 110  $\mu\text{l}$ .
  - Soluzione 2: a 100  $\mu\text{l}$  di campione trattato di urina si aggiungono 10  $\mu\text{l}$  di metanolo. Il volume totale è di 110  $\mu\text{l}$ .
- Campione di urina di un soggetto non esposto professionalmente  
Il campione è stato ottenuto dal Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Istituto Superiore di Sanità.
- Soluzione standard di S-PMA in acetonitrile  
Con una pipetta a doppia tacca, di classe A, sono stati prelevati 0,5 ml di soluzione madre in metanolo e introdotti in un vial, poi sono stati aggiunti 4,5 ml di acetonitrile prelevati mediante pipetta tarata. La soluzione finale ha concentrazione: 11,47 ng/ $\mu\text{l}$ .
- Soluzione standard di S-PMA in isopropanolo  
Con una pipetta a doppia tacca sono stati prelevati 0,5 ml di soluzione madre in metanolo e introdotti in un vial, poi sono stati aggiunti 4,5 ml di isopropanolo prelevati mediante pipetta tarata. La soluzione finale ha concentrazione: 11,47 ng/ $\mu\text{l}$ .
- Soluzione standard di S-PMA in metanolo  
Con una pipetta a doppia tacca sono stati prelevati 0,5 ml di soluzione madre in metanolo e introdotti in un vial, poi sono stati aggiunti 4,5 ml di metanolo prelevati mediante pipetta tarata. La soluzione finale ha concentrazione: 11,47 ng/ $\mu\text{l}$ .

## Vetreteria

La vetreria utilizzata viene lavata con acqua e detersivo, risciacquata con acqua distillata e asciugata in stufa a 110°C per circa dieci minuti; è stata esclusa dal trattamento in stufa la vetreria tarata. In questa sperimentazione sono stati usati: beute da 100 e 150 ml in Pirex; matracci tarati da 10 ml di classe A; vial a fondo piatto da 5 ml; pipette a doppia tacca di classe A; imbuti in Pirex; siringa da 250  $\mu\text{l}$ ; siringa da 20  $\mu\text{l}$ .

## Apparecchiature

Le apparecchiature utilizzate nello studio sono:

- *bilancia analitica*;
- *bilancia microanalitica*;
- *bilancia tecnica*;
- *deionizzatore e sterilizzatore di acqua*  
equipaggiato con ultramicrofiltro 0,005  $\mu\text{m}$ , cartuccia per rimozione di ioni, lampada UV;
- *HPLC*  
strumentazione Hewlett Packard: pompe e termostato serie 1100, iniettore Hewlett Packard serie 1050, colonna cromatografica C18 Restek Allure, particle size: 5  $\mu\text{m}$ , pore

size 60 Å, 25 cm x 2,1 mm di diametro interno (DI) Precolonna Restek C18 (10 x 2,1 mm). *Frit* Agilent da 2,0 µm (pore size) per colonna con DI = 2,1 mm. La connessione tra HPLC e spettrometro è effettuata mediante peek tubing da 1/16" e 0,005" DI, della ditta UpChurch;

- *spettrometro di massa*  
Esquire LC della Bruker, equipaggiato interfaccia API elettrospray della Hewlett Packard;
- *motore a pistone*  
Syringe Pump della Cole Parmer 74900-00,-05.

## Procedure sperimentali

### Procedura di estrazione urina

L'estrazione di un campione di urina, di un soggetto professionalmente non esposto a benzene, è stata effettuata nel Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Istituto Superiore di Sanità, secondo procedure standardizzate descritte brevemente qui di seguito.

La colonnina Sax viene attivata con 3 ml di metanolo e 1 ml di tampone fosfato 0,001 mol/l a pH 7 (aspirare senza portare a secco), si aggiungono 4 ml di campione di urina, precedentemente centrifugata, diluita con tampone fosfato (la diluizione utilizzata per campioni fino a 0,5 mg/l è 1:5), aspirando senza portare a secco. Successivamente si aggiungono 2 ml di NaOH 0,1 mol/l, in metanolo (aspirando senza portare a secco) e 2 ml di acido acetico 0,2 mol/l. A questo punto si aspira a fondo fino a secchezza della colonna. Si inseriscono le provette nuove nel *vacuum* e si raccoglie l'eluato ottenuto dal lavaggio con 2 ml di acido acetico 1,8 mol/l.

### Procedure per l'ottimizzazione strumentale

#### Modalità di acquisizione e di registrazione dello spettrometro

Esistono differenti modi per l'acquisizione e la registrazione dello spettro di massa:

- Registrazione di spettro in:
  - *profilo*  
In questo modo ciascun picco di massa dello spettro viene rappresentato nella sua forma originale. Questo consente una migliore visione della qualità dell'acquisizione, ma comporta un enorme utilizzo di spazio sul disco.
  - *centroide*  
In questo modo ogni picco di massa viene integrato e rappresentato su uno spettro come una barra la cui altezza è normalizzata rispetto al picco base.
- Acquisizione di spettro in:
  - *scansione*  
*Condizioni operative:* intervallo di massa (50-350) m/z, velocità di scansione 13000 m/z/s, risoluzione *normal* (0,6 FWHM), modalità di registrazione sia in centroide, che in profilo.

- *isolamento*  
*Condizioni operative:* per la ionizzazione in polarità negativa, massa isolata: 238, con una finestra di 4,0 unità (width); per la ionizzazione in polarità positiva, massa isolata: 240, con una finestra di 4,0 unità (width).
- *frammentazione*  
*Condizioni operative:* per la ionizzazione in polarità negativa, *cut-off* 64 e *amplitude* 0,54; per la ionizzazione in polarità positiva, *cut-off* 70 e *amplitude* 0,90.
- *polarità negativa*  
 Vengono rivelati gli ioni negativi, con ciascuna delle modalità sopra definite.
- *polarità positiva*  
 Vengono rivelati gli ioni positivi, con ciascuna delle modalità sopra definite.

### Modalità di introduzione del campione

L'introduzione nello spettrometro di massa della soluzione da analizzare può essere effettuata direttamente mediante una siringa a "infusione diretta", o indirettamente dall'HPLC con "loop injection", oppure accoppiando entrambe le tecniche con una "infusione diretta con flusso di eluente". L'acquisizione di spettri può quindi avvenire, nel dettaglio, in:

- *infusione diretta*  
 Una siringa guidata da un motore, fa fluire una soluzione direttamente all'interfaccia API elettrospray al flusso di 1000  $\mu\text{l/h}$ .  
 L'acquisizione è in scansione, isolamento e frammentazione; la registrazione dello spettro, in questo studio, è in modalità profilo.
- *loop injection*  
 L'iniettore del HPLC è collegato direttamente, senza colonna, all'interfaccia API elettrospray al flusso di 0,2 ml/min con un *loop* di 5  $\mu\text{l}$ . In questo studio l'acquisizione è in isolamento, la registrazione dello spettro è in modalità centroide.
- *infusione diretta con flusso di eluente*  
 L'effluente della siringa di infusione è miscelato, tramite una giunzione a T (Figura 12), all'effluente del HPLC con la colonna e confluiscono nell'interfaccia al flusso di 1000  $\mu\text{l/h}$  (= 16,7  $\mu\text{l/min}$ ) dal motore a pistone e di 200  $\mu\text{l/min}$  dalle pompe HPLC (tubi in peek da 1/16" e con 0,005" DI). In questo studio l'acquisizione è in isolamento e frammentazione, la registrazione dello spettro, è in modalità profilo.

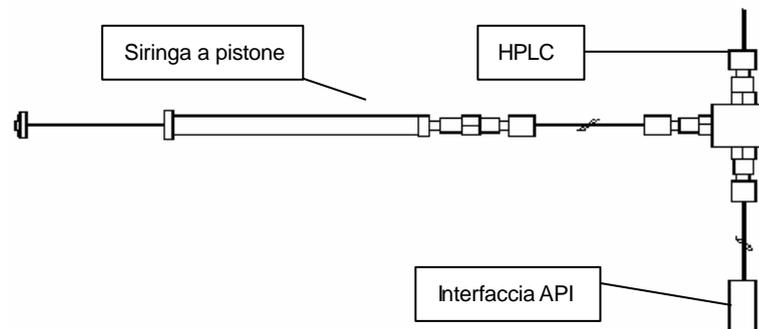


Figura 12. Schema del meccanismo di infusione diretta con flusso di eluente

– *HPLC-MS*

L'effluente proveniente dal HPLC, passando attraverso la colonna, è direttamente connesso all'interfaccia.

In questo studio l'acquisizione è, di volta in volta, in scansione, isolamento e frammentazione, la registrazione dello spettro, è in modalità centroide, i flussi sono riportati nella sezione HPLC.

### Calibrazione dello spettrometro

Una soluzione calibrante (PPG, polipropilenglicole, *tune mix*, fornita dalla ditta Hewlett Packard), viene immessa all'interfaccia mediante infusione diretta. Viene così effettuata, per confronto con masse note della soluzione calibrante, la calibrazione dell'asse delle masse, dell'isolamento e della frammentazione; lo strumento è stato calibrato su tre masse, in modalità positiva: 118,09 m/z, 322,05 m/z e 622,03 m/z. Questa operazione viene ripetuta ogni quindici giorni circa o in caso di una perdita di segnale durante le analisi.

### Ottimizzazione dei parametri dello spettrometro e dell'interfaccia

Le prove per l'ottimizzazione dei parametri dello spettrometro sono state eseguite utilizzando lo standard di acido S-PMA in metanolo (11,47 ng/μl), introdotto prima in infusione diretta, con un flusso di 1000 μl/h, per controllare unicamente la risposta dello spettrometro, in seguito in infusione diretta con flusso di eluente. In questa maniera la composizione dell'eluente all'interfaccia è determinata sostanzialmente dalla composizione dell'eluente dal HPLC dato l'elevato FD (Fattore di Diluizione) che si ricava dal rapporto dei flussi della pompa a siringa e del HPLC; il valore della concentrazione (C) che arriva all'ago nebulizzatore, si può ottenere dividendo la concentrazione iniziale per il FD:

$$FD = 0,2 \text{ ml/min}/1000 \text{ } \mu\text{l/h} = 200 \text{ } \mu\text{l/min}/16,67 \text{ } \mu\text{l/min} = 12$$

$$C_{\text{finale}} = 11 \text{ ng}/\mu\text{l}/12 = 0,916 \text{ ng}/\mu\text{l}.$$

Sono state effettuate prove, sia in positivo sia negativo, con standard di S-PMA in acetonitrile, isopropanolo e metanolo, in infusione diretta e con flusso di eluente e in *loop injection*, con modalità di acquisizione dello spettro in scansione e massa/massa (isolamento e frammentazione), registrando in profilo.

L'ottimizzazione finale è stata effettuata a condizioni di concentrazione dell'analita prossime a quelle attese in campioni reali per evitare una possibile saturazione della trappola ionica: sono stati ottimizzati i parametri della trappola ionica (*accumulation time*, *target*, *max accumulation time*) con le soluzioni di 11,47 ng/μl, e con 229,36 pg/μl. Sono state fatte iniezioni dello standard di 229,36 pg/μl, in massa/massa, applicando i seguenti due diversi set di parametri:

*accumulation time* = 8 ms

target = 20000 \_\_\_\_\_ ottenuti con la soluzione di 11,47 ng/μl

*max accumulation time* = 250 ms

e

*accumulation time* = 3 ms

target = 1500 \_\_\_\_\_ ottenuti con la soluzione di 229,36 pg/μl

*max accumulation time* = 250 ms

Per valutare ulteriori incrementi di sensibilità, i parametri dell'analizzatore sono stati ottimizzati anche per una soluzione standard di 22,94 pg/μl, quest'ultima è stata poi iniettata nel LC-MS con i parametri relativi allo standard di 11,47 ng/μl, e con quelli del 22,94 pg/μl.

*accumulation time* = 2 ms

target = 1000

*max accumulation time* = 250 ms

ottenuti con la soluzione di 22,94 pg/μl

Nella Tabella 1 sono riportati i parametri ottimizzati dello spettrometro e dell'interfaccia.

**Tabella 1. Riepilogo dei valori ottimizzati per lo spettrometro di massa**

Parametro	Valore ottimizzato
<i>Nebulizer</i>	30 psi
<i>Dry gas</i>	10 l/min
Temperatura	200 °C
<i>Trap drive</i>	25
<i>Skimmer 1</i>	- 15 V
<i>Skimmer 2</i>	-6 V
<i>Lens 1</i>	5 V
<i>Lens 2</i>	60 V
<i>Octopole RF</i>	120 Vpp
<i>Octopole</i>	-2 V
<i>Octopole D</i>	-2 V
<i>Cap exit offset</i>	-40 V
<i>Capillary</i>	+4000 V
<i>End plate offset</i>	-500 V

Sono stati riportati in questa parte i procedimenti operativi essenziali dell'ottimizzazione. Poiché essa comporta un processo interattivo in cui le azioni sono strettamente connesse all'interpretazione dei loro effetti, questa parte verrà abbondantemente ripresa nella sezione "Risultati e discussione".

## Condizioni HPLC

L'analisi HPLC degli standard è stata effettuata in isocratica, a varie percentuali di fase organica (metanolo) e fase acquosa (acqua, soluzione di AcOH e di AcONH<sub>4</sub>), mentre il campione di urina è stato analizzato con il gradiente descritto nella Tabella 2.

**Tabella 2. Programma di eluizione HPLC**

Tempo	% metanolo	Flusso
0 minuti	20	0,2 ml/min
5 minuti	90	0,2 ml/min
10 minuti	90	0,2 ml/min
11 minuti	100	0,3 ml/min
16 minuti	100	0,3 ml/min
20 minuti	20	0,2 ml/min

## Retta di calibrazione

Sono stati preparati standard di S-PMA (in metanolo) a partire dalla soluzione madre, per diluizione successiva in un intervallo di concentrazione (229,36-5,73 pg/ $\mu$ l) e sono stati iniettati (in ordine crescente di concentrazione e intervallate da bianchi) per tre volte in due giorni consecutivi.

L'acquisizione è stata effettuata in polarità positiva, acquisendo lo spettro di frammentazione ed estraendo dal TIC (Total Ion Charge, carica ionica totale) le masse di frammentazione.

Nella Tabella 3 si riporta uno schema riassuntivo delle condizioni operative per la determinazione dell'S-PMA mediante LC-ES-MS/MS.

**Tabella 3. Schema riassuntivo delle condizioni operative per la determinazione dell'S-PMA**

Apparecchiatura	Parametro	Valore
HPLC	<i>Fase mobile</i>	metanolo/acetato di ammonio $10 \times 10^3$ mol/l
	<i>Gradiente</i>	20-90% metanolo in 5 minuti, 5 minuti isocratica al 90% MeOH
	<i>Colonna</i>	C18 25 cm; 2,1 mm DI; 5 $\mu$ m, 60 Å.
Spettrometro di massa	<i>Polarity</i>	positiva
	<i>Dry gas</i>	10 l/min
	<i>Nebulizer</i>	30 psi
	<i>Dry temperature</i>	200 °C
	<i>Trap drive</i>	25
	<i>Cap exit</i>	+ 55 V
	<i>Cap exit offset</i>	+ 40 V
	<i>Skimmer 1</i>	+ 15 V
	<i>Skimmer 2</i>	+ 6 V
	<i>Octopole</i>	+ 2 V
	<i>Octopole D</i>	+ 2 V
	<i>Octopole RF</i>	120 Vpp
	<i>Lens 1</i>	5 V
	<i>Lens 2</i>	60 V
	<i>End plate offset</i>	+500 V
	<i>Capillary</i>	- 4000 V
	<i>Isolation</i>	240 m/z
<i>Width</i>	4 m/z	
<i>Fragmentation cut-off</i>	60 m/z	
<i>Amplitude</i>	0,40 V	

# RISULTATI E DISCUSSIONE

## Sviluppo del metodo

L'approccio allo sviluppo di un metodo analitico mediante LC-MS comporta una valutazione congiunta delle numerose problematiche presenti nell'utilizzo dello spettrometro, delle altrettanto numerose difficoltà esistenti in una separazione cromatografica e comporta infine la necessità di coniugare le esigenze di entrambe le tecniche strumentali con quelle dell'interfaccia in modo da renderle compatibili.

L'analisi dell'S-PMA, metabolita del benzene, è stata condotta mediante ionizzazione in polarità sia negativa, come riportato in letteratura (76), che positiva, per mettere in evidenza eventuali differenze. Al fine di trovare le condizioni di massimo segnale dell'analita, l'ottimizzazione dei parametri LC-MS è stata effettuata con un flusso continuo di soluzione di standard S-PMA in infusione. In queste condizioni, inserendo opportunamente la massa del composto in esame nella finestra di dialogo del "tuning", lo strumento dispone automaticamente i valori per tutti i parametri che regolano la guida ottica e la trappola:

- *Skimmer 1;*
- *Skimmer 2;*
- *Cap exit offset;*
- *Octopole;*
- *Octopole ?;*
- *Octopole RF;*
- *Lens 1;*
- *Lens 2;*
- *Trap drive.*

Il primo passo è stato quello di stabilire, seguendo l'andamento del segnale dell'analita, un tempo d'accumulazione tale da non saturare la trappola (in caso contrario, il profilo dei picchi di massa si allarga e deriva verso masse più alte), cui corrisponde un valore massimo di carica ionica attuale (Ion Charge Control actual: ICC actual). A questo punto si attiva l'ICC in modo tale che lo strumento selezioni automaticamente il tempo di accumulazione, in relazione alla quantità di ioni che entrano in trappola.

È possibile quindi ottimizzare i parametri mediante due operazioni di *tuning*:

- *easy*  
permette all'operatore di intervenire sui parametri relativi alla nebulizzazione della soluzione e su alcuni di quelli relativi ai voltaggi della regione di focalizzazione e trasmissione ionica;
- *expert*  
molto più complesso, offre libero accesso a tutti i parametri.

Un processo essenziale, al fine di ottimizzare il segnale in condizioni più vicino possibile alla situazione analitica reale, si basa sull'introduzione della soluzione dello standard in infusione diretta con flusso di eluente. In questo caso il campione arriva alla camera di ionizzazione più diluito, rispetto all'infusione diretta citata prima, e simula le reali condizioni di analisi.

Successivamente all'ottimizzazione dei parametri strumentali dello spettrometro di massa, sono state ricercate le condizioni cromatografiche migliori affinché fosse ottimizzata la separazione, la simmetria e la durata del picco.

Esplorate varie soluzioni per la selezione della fase mobile (H<sub>2</sub>O/metanolo; acido acetico 0,1%/metanolo; acetato di ammonio/metanolo), e dopo aver trovato le condizioni migliori, il campione reale è stato analizzato in polarità negativa e positiva.

Lo ione (M+1)<sup>+</sup> del campione è risultato più intenso di un ordine di grandezza rispetto al (M-1)<sup>-</sup> inoltre la massa/massa dell'S-PMA in modalità positiva provoca una vantaggiosa frammentazione dello ione genitore in più ioni-figlio rispetto alla ionizzazione negativa, comportando così una maggiore identificabilità del composto. Per questo motivo è stata scelta la modalità di ionizzazione positiva per la quantificazione del composto in esame. Inoltre, utilizzando queste condizioni sperimentali, l'analisi quantitativa è stata eseguita operando in massa-massa con il vantaggio di un incremento di sensibilità e di specificità.

L'analisi quantitativa è stata effettuata tramite retta di taratura ed è stato determinato il limite di rivelabilità in circa 10 pg iniettati.

Per stimare l'accuratezza dell'analisi, è stata effettuata una aggiunta di standard al campione reale e determinata la differenza rispetto al campione tal quale.

Per valutare la precisione di risposta, il campione reale è analizzato in cinque repliche.

## Ottimizzazione dei parametri dello spettrometro di massa

### Ionizzazione in polarità negativa

In Figura 13 è riportata la formula di struttura dell'acido S-PMA e dello ione di massa 238 m/z, relativo allo ione molecolare M meno H<sup>+</sup> = (M-1)<sup>-</sup>. È stato così seguito l'andamento dello ione di massa 238 m/z = (M-1)<sup>-</sup>.

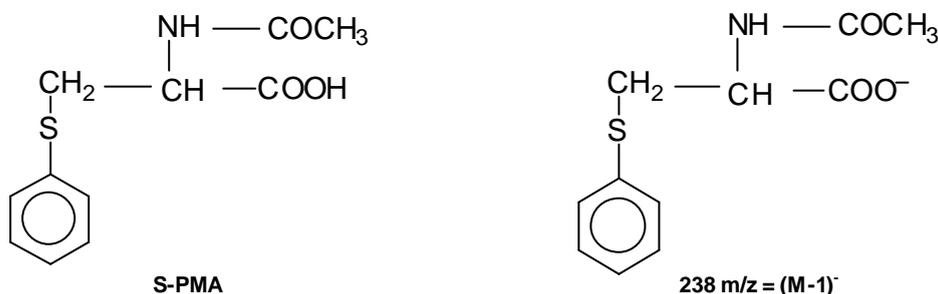


Figura 13. Formule di struttura dell'S-PMA (M) e dello ione (M-1)<sup>-</sup>

L'ottimizzazione dei parametri strumentali dello spettrometro di massa, inerenti all'interfaccia e alla guida ottica, sono stati effettuati con una soluzione standard di S-PMA 11 ng/μl, in metanolo, in infusione diretta.

I parametri relativi alla sorgente (*Nebulizer*, *Dry Gas* e *Temperatura*) devono essere ottimizzati manualmente dall'operatore. Nella Tabella 4 sono riportati i diversi valori esplorati per questi tre componenti e le massime intensità di segnale, evidenziate su fondo grigio.

Successivamente, inserendo la massa 238 nel *tune easy*, i valori dei parametri relativi alla regione di trasporto e focalizzazione ionica (*Skimmer 1*, *Octopole* e *Trap drive*) vengono automaticamente disposti dallo strumento. Ciò nonostante, è stato visto che modificando manualmente questi valori si può ottenere un segnale con intensità maggiore.

Tabella 4. Variazioni parametri sorgente

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Nebulizer</b>	2 psi	553198
	4 psi	677250
	6 psi	568381
	8 psi	718194
	15 psi	752081
	18 psi	759399
	20 psi	767853
	30 psi	593265
	40 psi	412958
	50 psi	458690
<b>Dry gas</b>	1 l/min	719184
	2 l/min	634784
	3 l/min	672913
	5 l/min	767853
	7 l/min	785007
	10 l/min	862108
<b>Temperatura</b>	12 l/min	694596
	50 °C	901452
	100 °C	882764
	150 °C	847929
	200 °C	817141
	250 °C	862108
	350 °C	630113

Nella Tabella 5 sono riportati i valori dei parametri e le relative intensità ottenute nell'intervallo di esplorazione: il valore trovato dall'operatore cui corrisponde l'intensità maggiore è riportato su fondo grigio, mentre il valore assegnato dallo strumento è riportato in grassetto. In alcuni casi si è trovata corrispondenza tra valore automatico e manuale, comunque si può notare l'importanza dell'intervento manuale.

Tabella 5. Variazione parametri *tune easy*

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Skimmer 1</b>	-5 V	1188
	-10 V	438401
	-15 V	693871
	-20 V	478241
	<b>-25,3 V</b>	<b>207832</b>
	-30 V	134905
	-40 V	59848
<b>Octopole</b>	-1 V	201679
	-2 V	582380
	<b>-2,39 V</b>	<b>207832</b>
	-2,5 V	667487
	-3 V	515412
<b>Trap drive</b>	-4 V	274304
	15	78677
	25	799240
	35	609857
	<b>43,4</b>	<b>438305</b>
	55	245688

L'intensità del segnale di interesse, ottenuta modificando i parametri del *tune easy*, può essere ulteriormente aumentata agendo sui restanti parametri. Questi sono presenti nel *tune expert*, e sono:

- *Source*
  - *Capillary*
  - *End plate offset*
  - *Nebulizer*
  - *Dry gas*
  - *Temperatura*
- *Expert parameter setting*
  - *Skimmer 1*
  - *Skimmer 2*
  - *Cap exit offset*
  - *Octopole*
  - *Octopole ?*
  - *Octopole RF*
  - *Lens 1*
  - *Lens 2*
  - *Trap drive*

Anche in questo caso, i valori assegnati dallo strumento ai vari parametri, sono stati modificati manualmente, ottenendo, in genere, intensità di risposta maggiori. Per ogni parametro sono riportati in grassetto i valori assegnati dallo strumento, e su fondo grigio (Tabella 6), i valori corrispondenti alle intensità maggiori, trovati dall'operatore; laddove i parametri corrispondono sono presenti entrambe le notazioni. Sono stati migliorati: la *Lens 2*, l'*Octopole*, il *Cap exit offset* e l'*End plate offset*.

**Tabella 6. Variazione parametri accessibili dal *tune expert***

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Skimmer 2</b>	-3 V	0
	-4 V	395742
	-5 V	726216
	<b>-6 V</b>	<b>901452</b>
	-7 V	893644
	-8 V	778918
	-10 V	601134
	-12 V	506478
	-15 V	242884
<b>Lens 1</b>	1 V	233969
	3 V	291993
	4 V	370397
	<b>5 V</b>	<b>539023</b>
	6 V	337190
	7 V	265925
	10 V	285130
	12 V	206279
	15 V	219800
	18 V	206494

*segue*

continua

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Lens 2</b>	30 V	26531
	40 V	198465
	50 V	297928
	<b>60 V</b>	<b>539023</b>
	70 V	399467
	80 V	341340
	90 V	233425
	100 V	262690
<b>Octopole RF</b>	150 V	134109
	20 Vpp	237305
	40 Vpp	402262
	60 Vpp	482266
	80 Vpp	536410
	100 Vpp	546560
	110 Vpp	567538
	<b>120 Vpp</b>	<b>799240</b>
	140 Vpp	588374
	160 Vpp	546004
	180 Vpp	498759
	200 Vpp	548032
	220 Vpp	487439
	240 Vpp	501503
260 Vpp	460000	
280 Vpp	471546	
300 Vpp	489349	
<b>Octopole</b>	-1 V	160864
	-1,5 V	407208
	<b>-2 V</b>	<b>589074</b>
	<b>-2,5 V</b>	<b>515339</b>
	-3 V	393622
	-3,5 V	212687
	-4 V	93105
<b>Octopole D</b>	0 V	368342
	-1 V	481855
	-1,5 V	583667
	<b>-2 V</b>	<b>597708</b>
	-2,5 V	546939
	-3 V	589074
	-3,5 V	505003
	-4 V	429057
	-4,5 V	307182
	-5 V	245494
<b>Cap exit offset</b>	-6 V	150932
	20 V	1751
	10 V	595799
	0 V	874192
	-1 V	861261
	-2 V	900862
	-5 V	862686
	-10 V	816021
	-20 V	778143
	-30 V	886297
	<b>-40 V</b>	<b>950336</b>
-50 V	923121	

segue

continua

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Cap exit offset</b> (continua)	-60 V	591184
	<b>-69,7 V</b>	<b>597708</b>
	-70 V	517819
	-72 V	581740
	-74 V	527488
	-78 V	609771
	-82 V	670933
	-86 V	602552
	-90 V	613098
	-95 V	599705
	-100 V	574650
	-120 V	325570
	-140 V	64935
	<b>Capillary</b>	+2500 V
+3000 V		299389
+3500 V		699533
<b>+4000 V</b>		<b>923121</b>
+4500 V		512206
+5000 V		296546
<b>End plate offset</b>	-800 V	741839
	-700 V	834719
	-600 V	832143
	-550 V	949967
	<b>-500 V</b>	<b>1043221</b>
	-450 V	982516
	-400 V	1021453
	-300 V	1000488
	-200 V	729412
	-1000 V	713849
-100 V	596218	

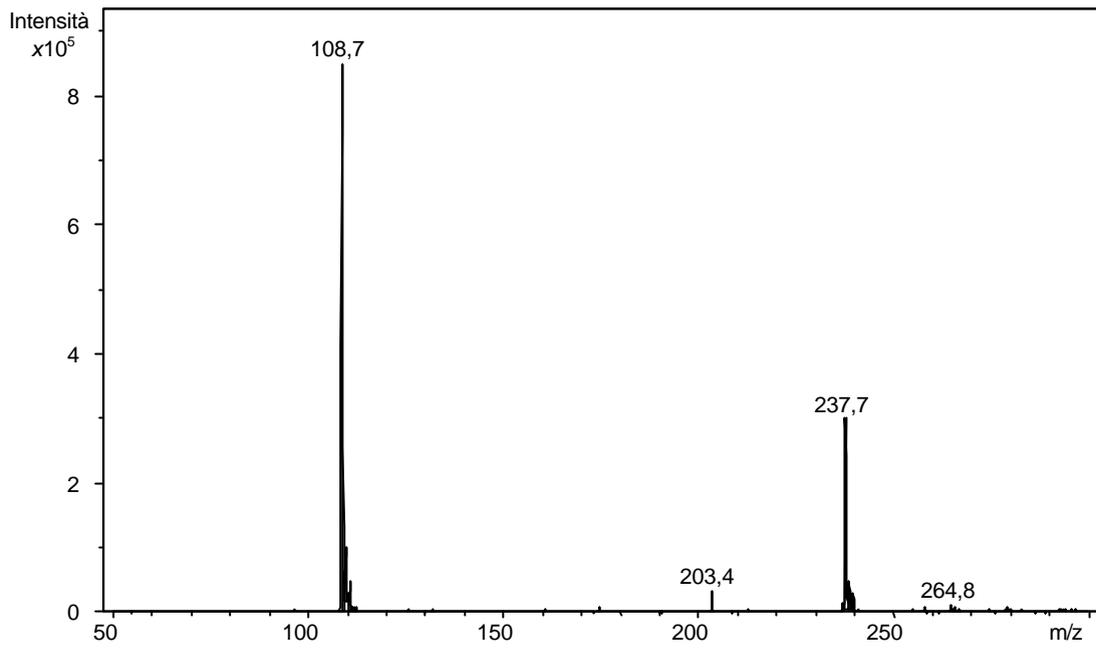
La Tabella 3 riassume tutti questi parametri ottimizzati.

Tali parametri devono essere ricontrrollati, ed eventualmente corretti, dopo ogni calibrazione, e dopo avere effettuato un certo numero di iniezioni: i solventi, ma soprattutto i campioni, possono sporcare le lenti e gli *skimmer*, che quindi potrebbero necessitare di potenziali leggermente diversi rispetto a quelli ricercati in precedenza. È importante evidenziare, attraverso l'esame degli spettri di massa in modalità profilo, come sia importante non fermarsi all'ottimizzazione automatica dei parametri strumentali, ottenuti mediante *tune easy* ma intervenire variando i valori delle grandezze presenti nel *tune expert*, in tal modo, difatti, è stato possibile incrementare la risposta del segnale dell'analita. A questo proposito si osservino i profili nelle Figure 14, 15, 16, dove è evidente il guadagno di intensità del segnale.

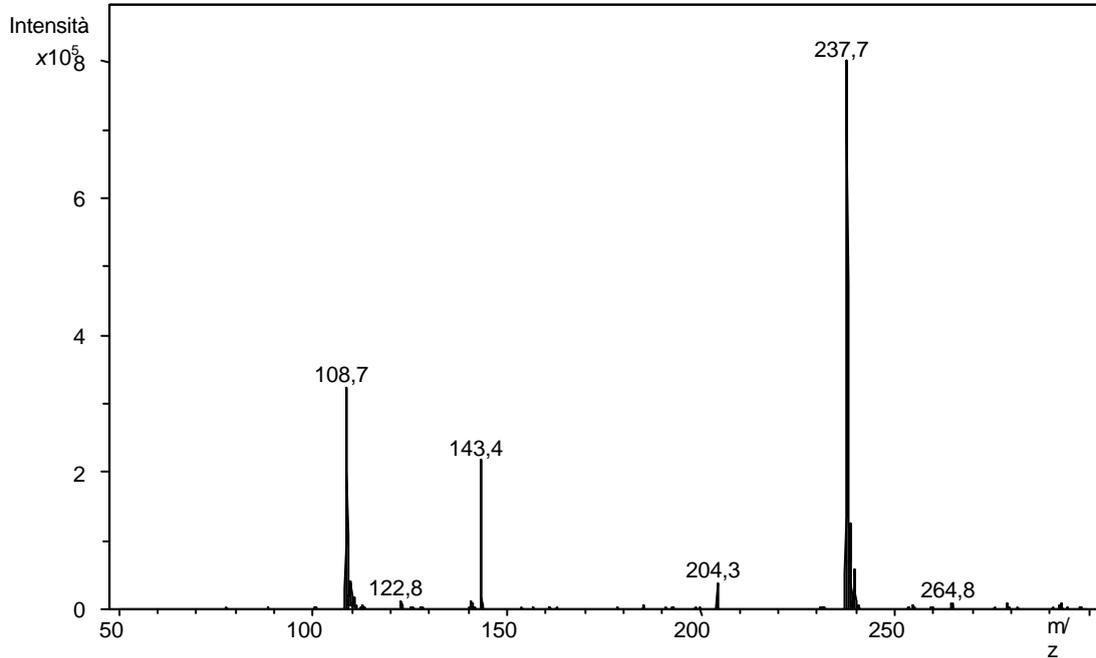
I parametri più influenti per l'ottimizzazione sono:

- *Cap exit offset* (presente soltanto nel *tune expert*);
- *Trap drive*;
- *Scan resolution*.

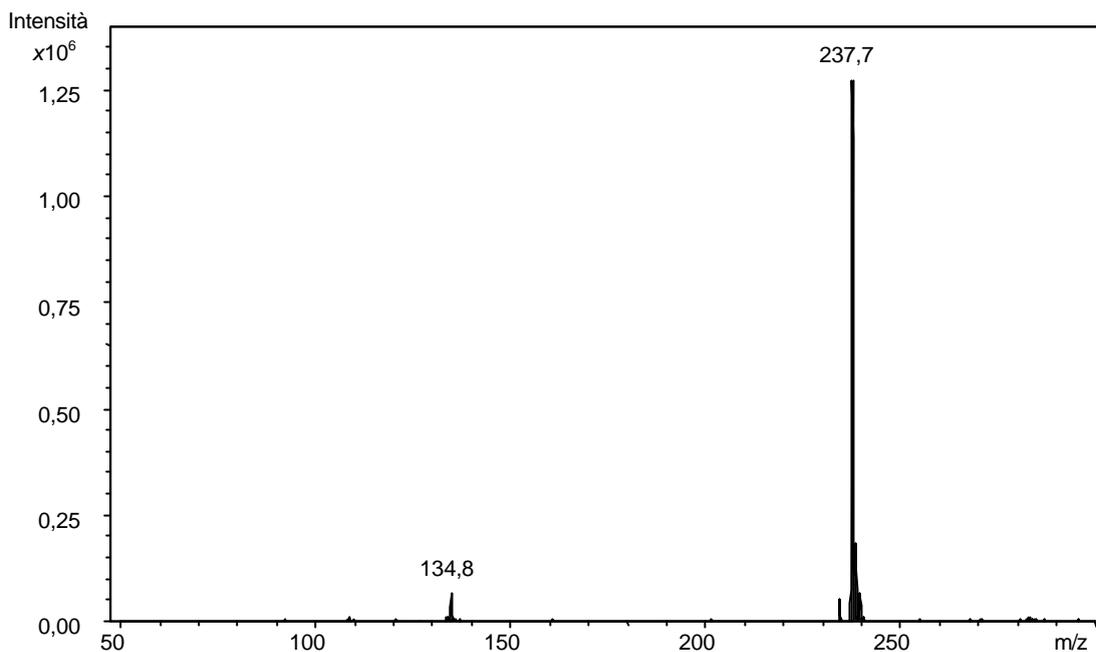
Il *Cap exit offset* è presente soltanto nel *tune expert* e ha permesso una massimizzazione del segnale del genitore, a spese dello ione figlio. Successivamente sono stati valutati e ottimizzati i parametri che controllano le operazioni di massa/massa, quindi l'isolamento e la frammentazione.



**Figura 14. Standard di S-PMA (11 ng/μl)**  
 in metanolo, ionizzazione negativa, scansione; iniezione diretta: flusso 1000 μl/h.  
 Profilo ottenuto dopo la sola ottimizzazione della trappola ionica  
 e dopo avere inserito la massa 238 m/z



**Figura 15. Standard di S-PMA (11 ng/μl)**  
 in metanolo, ionizzazione negativa, scansione, iniezione diretta: flusso 1000 μl/h.  
 Profilo ottenuto dopo ottimizzazione dei parametri del *tune easy*



**Figura 16. Standard di S-PMA (11 ng/μl), ionizzazione negativa, scansione;  
iniezione diretta: flusso 1000 μl/h.  
Profilo ottenuto dopo ottimizzazione dei parametri del *tune expert***

Una volta effettuate le correzioni sui parametri della sorgente, sono stati valutati anche i valori inerenti al processo di frammentazione: *cut-off* e *amplitude*. Nel nostro caso l'esclusione del fast calculation e l'abbassamento del *cut-off*, rispetto al valore impostato dallo strumento, hanno permesso un aumento del segnale relativo allo ione figlio.

Le prove suddette sono state effettuate in infusione; la fase successiva è stata quella di ottenere una ottimizzazione in condizioni il più possibile vicino alle effettive condizioni analitiche.

A questo scopo si è operato in infusione diretta con flusso di eluente, in modo tale che lo standard fluisca, continuamente, nello spettrometro di massa con lo stesso flusso adottato in presenza della colonna (0,2 ml/min).

A causa della variazione della velocità di flusso tra infusione diretta (1000 μl/h = 16,7 μl/min) e pompe del HPLC (200 μl/min) è stata necessaria la sostanziale revisione dei parametri della sorgente.

Infatti, la soluzione proveniente dal HPLC è introdotta con una pressione più elevata, comportando una relativa diminuzione di segnale (si ricorda la disposizione ortogonale tra ago nebulizzatore e capillare); per questo motivo è necessaria la variazione dei parametri che regolano la nebulizzazione e desolvatazione riottimizzando nuovamente la risposta.

Questa considerazione ha comportato dei cambiamenti limitatamente alla temperatura del gas in controcorrente e il *nebulizer*, mentre il *dry gas* è risultato invariato (Tabella 7).

Una volta ricercati tutti i parametri che massimizzano il segnale dell'analita, e aver creato un metodo, sono state effettuate alcune prove per la scelta del solvente più adatto alla ionizzazione dell'analita: in infusione diretta sono stati introdotti gli standard di S-PMA diluiti in metanolo, in isopropanolo e in acetonitrile (tutti a 11 ng/μl) che sono stati analizzati in scansione, isolamento e frammentazione.

**Tabella 7. Ottimizzazione effettuata in infusione diretta con flusso di eluente**

Parametro	Valore	Intensità del segnale (m/z 238)
<b>Nebulizer</b>	2 psi	4839
	4 psi	126255
	6 psi	208100
	8 psi	126739
	15 psi	96221
	18 psi	166047
	20 psi	117751
	30 psi	365207
	40 psi	165412
	50 psi	150379
<b>Dry gas</b>	60 psi	142949
	1 l/min	28325
	2 l/min	43207
	3 l/min	45598
	5 l/min	64270
	7 l/min	242551
	10 l/min	257232
<b>Temperatura</b>	12 l/min	252611
	50 °C	257232
	100 °C	45007
	150 °C	530066
	200 °C	596068
	250 °C	546081
	350 °C	460396

È indicativo il valore del segnale in profilo della massa isolata (238) (Tabella 8).

**Tabella 8. Differenze di intensità di segnale della massa 238, relative a standard di S-PMA preparati in solventi diversi**

Standard di S-PMA	Intensità del segnale (m/z 238)
in metanolo	123492
in isopropanolo	34237
in acetonitrile	22064

Quindi, per quanto riguarda questa modalità, la risposta del segnale in metanolo è stata superiore a quella in acetonitrile e in isopropanolo, questa è concorde anche con il fatto che l'acetonitrile è un solvente aprotico che quindi non scambia protoni con l'analita, l'isopropanolo a sua volta è protico, ma meno desolvatabile del metanolo.

### **Ionizzazione in polarità positiva**

Successivamente è stata esplorata la polarità di ionizzazione positiva; questa operazione non ha comportato modificazioni numeriche dei parametri strumentali (difatti la variazione di due unità di massa, da  $(M-1)^-$  a  $(M+1)^+$  non è rilevante e comporta soltanto una variazione di polarità associata ai voltaggi di lenti, *skimmer*, ottapoli, *end plate* e capillare.

Quindi in tutte le prove effettuate in modalità positiva si segue l'andamento dello ione molecolare protonato,  $M$  più  $H^+ = (M+1)^+$ ,  $m/z$  240 (Figura 17).



**Figura 17. Formule di struttura dell'S-PMA (M) e dello ione (M+1)<sup>+</sup>**

Analogamente a quanto eseguito in polarità negativa, sono stati esplorati i dati relativi alle eventuali differenze tra i tre solventi organici.

Per quanto riguarda la scelta del solvente tra il metanolo, l'acetonitrile e l'isopropanolo, come nel caso della ionizzazione negativa, gli standard di SPMA nei diversi solventi (di concentrazione 11 ng/μl) sono stati infusi direttamente nello spettrometro, ed è stato seguito l'andamento dello ione  $(M+1)^+$ ; in isolamento il segnale più intenso è stato registrato in metanolo, come riportato nella Tabella 8.

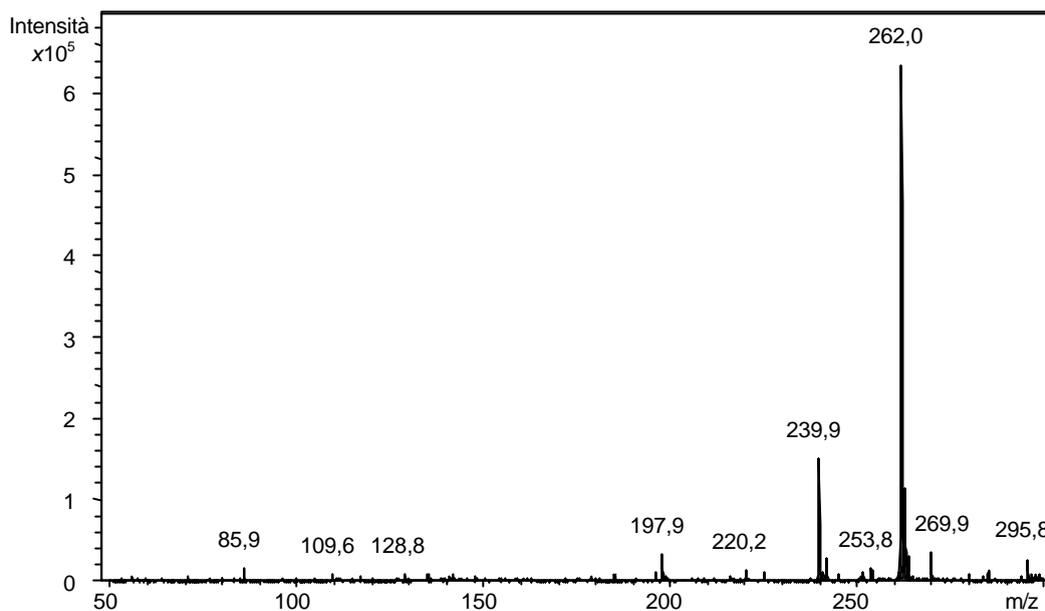
**Tabella 8. Differenze di intensità di segnale della massa 240, relative a standard di S-PMA preparati in solventi diversi**

Standard di S-PMA	Intensità del segnale (m/z 240)
in metanolo	67244
in isopropanolo	628
in acetonitrile	890

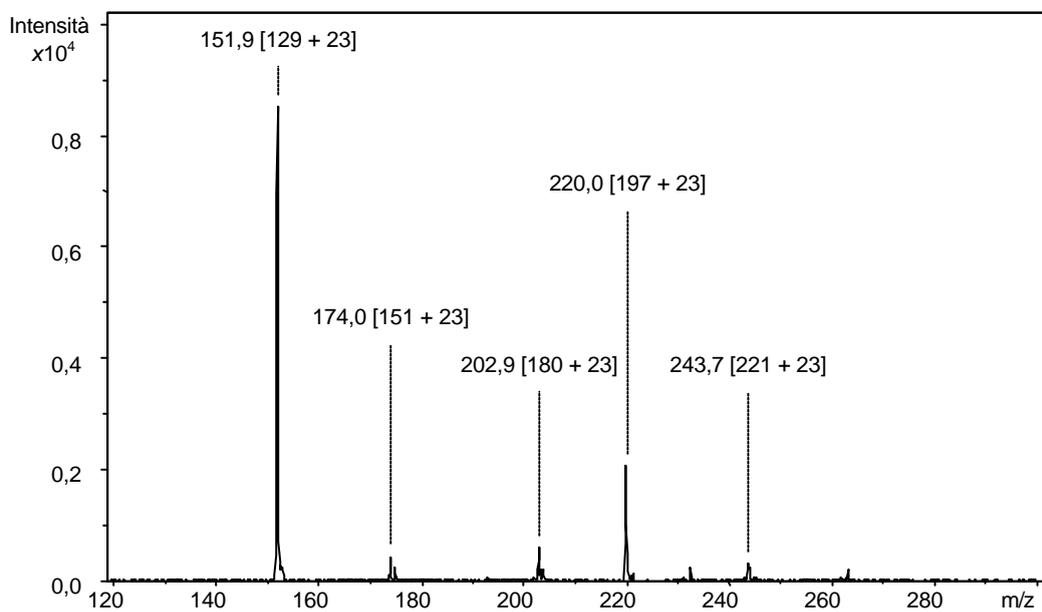
Questo risultato è comunque giustificabile dal fatto che l'acetonitrile è un solvente aprotico, che non favorisce quindi in soluzione la formazione dello ione  $(M+1)^+$ , mentre il metanolo, solvente protico, può cedere il protone per formare lo ione  $(M+1)^+$ . Non è però spiegabile il valore dell'isopropanolo, che pur essendo protico, dà un segnale più basso dell'acetonitrile.

Va notato che, nelle stesse condizioni, in scansione, è stato registrato lo ione 262 in tutti i solventi, nel metanolo con una intensità maggiore (356202 in acetonitrile, 634519 in metanolo, 66680 in isopropanolo); questo ione è stato interpretato come addotto sodico dell'S-PMA: infatti isolandolo e frammentandolo si ottengono gli stessi frammenti che si ricavano dalla frammentazione dello ione 240, aumentati di 23 unità di massa atomica, cioè della massa del sodio.

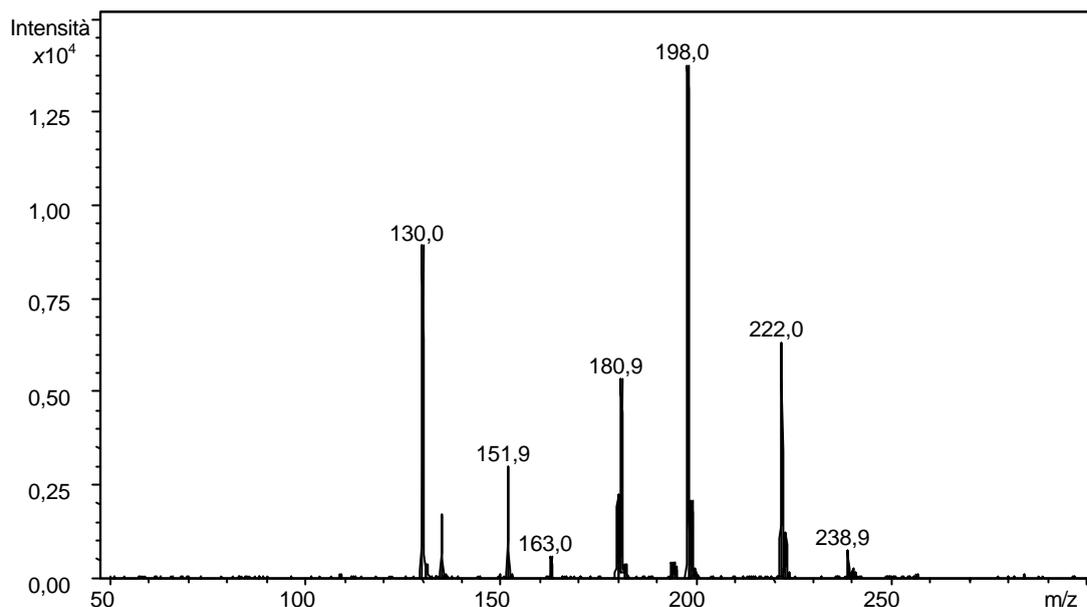
I profili presenti nelle Figure 18 e 19 mostrano, rispettivamente, la presenza dello ione 262 nello standard di SPMA, in metanolo, e la sua frammentazione. Quest'ultima può essere confrontata con quella della massa 240 =  $(M+1)^+$ , mostrata nella Figura 20.



**Figura 18. Standard di S-PMA (11 ng/μl) in metanolo, ionizzazione positiva, scansione; iniezione diretta: flusso 1000 μl/h**

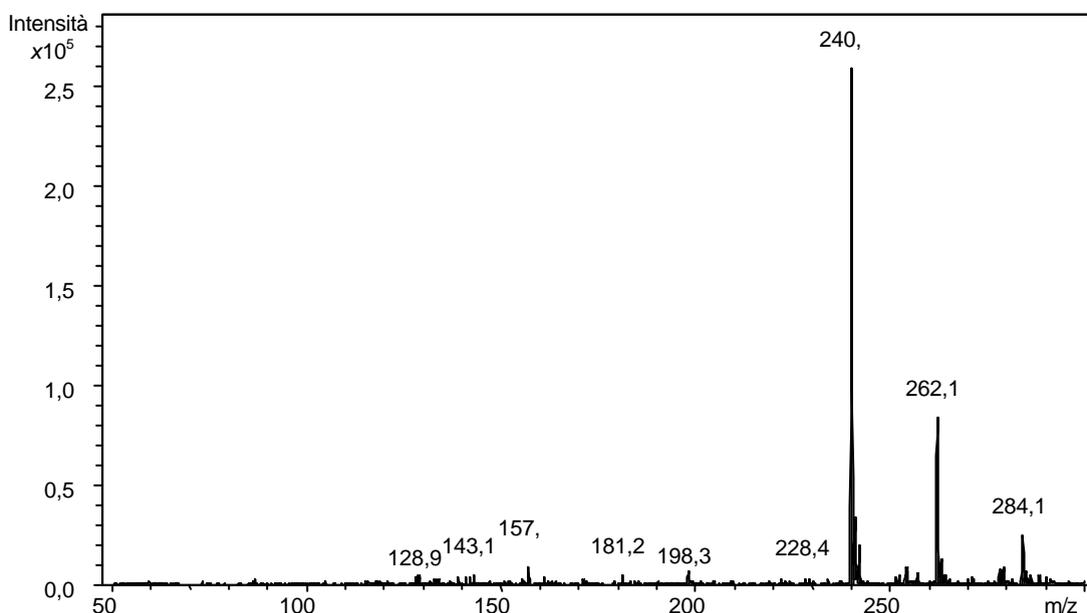


**Figura 19. Standard di S-PMA (11 ng/μl), in metanolo, ionizzazione positiva, frammentazione dello ione di massa 262; iniezione diretta: flusso 1000 μl/h**



**Figura 20. Standard di S-PMA (11 ng/μl) in metanolo, ionizzazione positiva, frammentazione dello ione 240; infusione diretta**

Successivamente si è operato in infusione diretta con flusso di eluente, ponendo il flusso del HPLC 0,2 ml/min e fissando la composizione della fase mobile al 90% di metanolo e al 10% di acetato di ammonio  $10 \times 10^3$  mol/l. In queste condizioni si è notata una diminuzione del segnale dello ione di massa 262 a favore della 240. Il tampone quindi favorisce la formazione dello ione  $(M+1)^+$ , come si può vedere dalla Figura 21.



**Figura 21. Standard di S-PMA (11 ng/μl) in metanolo, ionizzazione positiva, scansione; infusione diretta con flusso di eluente. Isocratica al 90% di MeOH e 10% di AcONH<sub>4</sub>**

Utilizzando come fase mobile l'acetato di ammonio e il metanolo, il confronto dell'intensità del segnale tra le due polarità di ionizzazione in entrambe le polarità di ionizzazione è favorevole alla ionizzazione positiva, sia in scansione che in massa/massa.

La differenza sostanziale tra polarità di ionizzazione positiva e negativa si trova nella differente frammentazione dello ione genitore. Infatti, mentre nella polarità negativa lo ione  $(M-1)^-$  produce un unico ione figlio, (ione di massa 109 m/z) (Figura 22), generato dalla perdita di  $CO_2$  e del gruppo  $CH_2=CH-NHCOCH_3$  (76), in quella positiva si ottengono più frammenti dalla massa  $(M+1)^+$ , i più intensi di questi hanno massa: 222 m/z, 198 m/z e 130 m/z; queste informazioni sono presenti nel profilo della Figura 20.

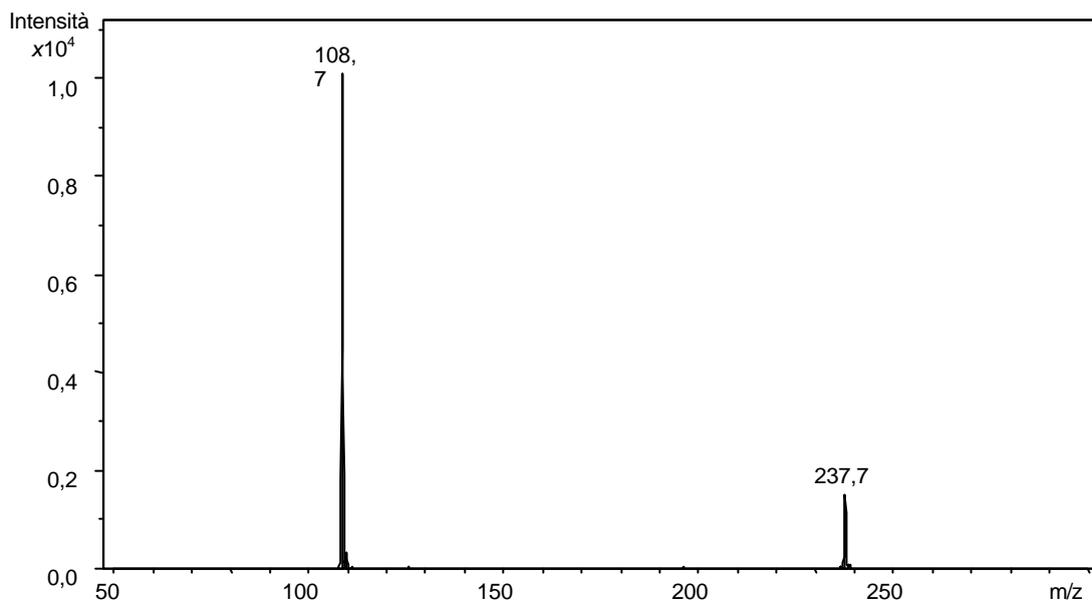


Figura 22. Standard di S-PMA (11 ng/ $\mu$ l) in metanolo, ionizzazione negativa, frammentazione dello ione 238; infusione diretta

Lo ione a massa 222 proviene dallo ione  $(M+1)^+ = 240$ , per perdita di acqua, così come la frammentazione dello ione a massa 240, può portare alla perdita di tiofenolo ( $C_6H_5SH = 110$ ), mentre lo ione di massa 198, proviene dalla rottura del legame C-N, con una migrazione di un atomo di H (a) dell'acile, perdendo così chetene ( $CH_2CO = 42$ ) (81) (Figura 23).

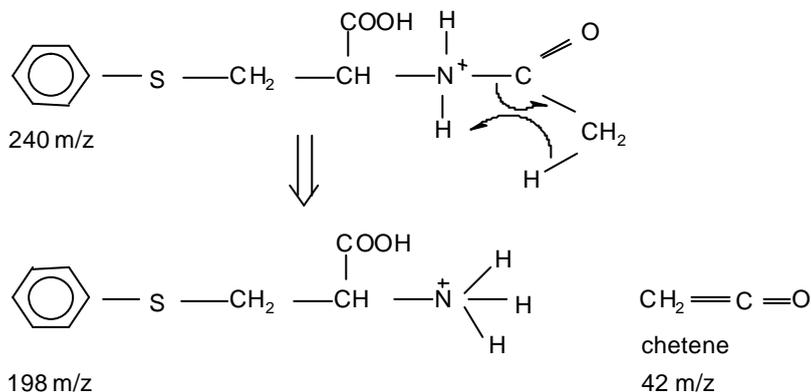


Figura 23. Schema di frammentazione positiva che dallo ione  $(M+1)^+ = 240$  genera lo ione 198

Dal punto di vista analitico una frammentazione in più ioni del genitore rappresenta un vantaggio, in quanto permette una più accurata identificazione del composto e un incremento della sensibilità del metodo.

## Ottimizzazione delle condizioni cromatografiche

Inizialmente, allo scopo di stimare l'intervallo di composizione di fase mobile di eluizione del picco dell'analita, è stato impostato il seguente gradiente lineare: dal 5% di metanolo (95% di acqua) al 100% di metanolo, in 15 minuti e con un flusso di 0,2 ml/min.

Il picco cromatografico dello standard eluisce in un intervallo di composizione compreso tra il 70% e il 100% di fase organica.

Per coniugare le esigenze cromatografiche di eluizione e risoluzione con la massimizzazione del segnale analitico, sono state effettuate le seguenti analisi isocratiche in ionizzazione negativa con iniezioni di 500 pg di standard S-PMA:

- 100% metanolo 0% acqua
- 90% metanolo 10% acqua
- 80% metanolo 20% acqua
- 70% metanolo 30% acqua
- 60% metanolo 40% acqua
- 50% metanolo 50% acqua
- 40% metanolo 60% acqua

In modalità positiva è stata effettuata la prova al 90% di metanolo e al 10% di acqua. In queste condizioni permaneva una certa asimmetria del picco cromatografico.

Quindi sono state effettuate ulteriori analisi isocratiche iniettando ancora 500 pg di S-PMA in modalità negativa, con le seguenti composizioni della fase mobile:

- 100% metanolo 0% acido acetico 0,1%
- 90% metanolo 10% acido acetico 0,1%
- 80% metanolo 20% acido acetico 0,1%

L'isocratica al 90% di metanolo e 10% di acido acetico 0,1% è stata provata anche in positivo.

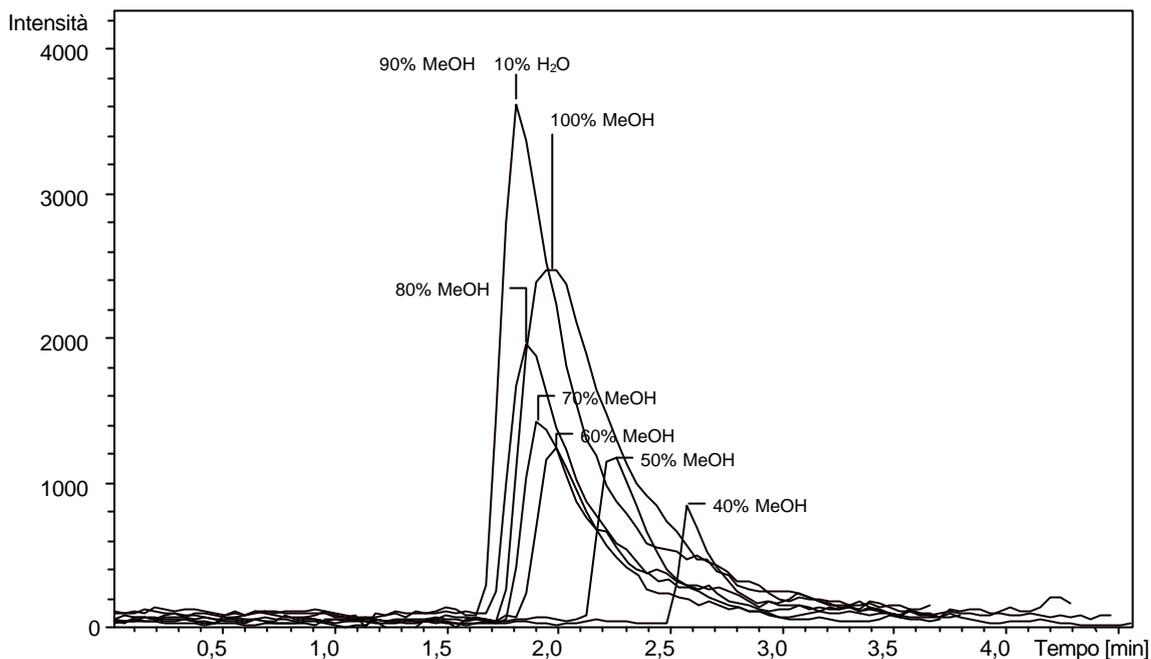
Infine sono state effettuate delle prove, in entrambe le modalità di ionizzazione, utilizzando una soluzione di acetato di ammonio  $\sim 10 \times 10^3$  mol/l in luogo della soluzione di acido acetico, sempre iniettando 500 pg di SPMA, in isolamento, con isocratica al 90% metanolo, 10% acetato di ammonio  $10 \times 10^3$  mol/l con un flusso di 0,2 ml/min.

Lo studio del cromatogramma di massa 238 m/z, in isolamento, ha mostrato che la fase mobile più soddisfacente è stata 90% metanolo, 10% acqua (Figura 24).

Difatti, in questo caso, il picco cromatografico risulta più stretto, con un tempo di eluizione di circa un minuto e mezzo, ma ancora con una scodatura finale.

In modalità positiva è stata effettuata la prova al 90% di metanolo e al 10% di acqua e il picco cromatografico risultante è più intenso di quello in negativo (più di un ordine di grandezza).

Il passo successivo è stato quello di cercare una fase mobile che non comportasse l'asimmetria del picco cromatografico. I picchi asimmetrici devono essere evitati, poiché la scodatura comporta una cattiva risoluzione e una riduzione della precisione.



**Figura 24. Massa 238; ionizzazione negativa: cromatogrammi dello standard S-PMA 500 pg iniettati, varie isocratiche tra MeOH e H<sub>2</sub>O**

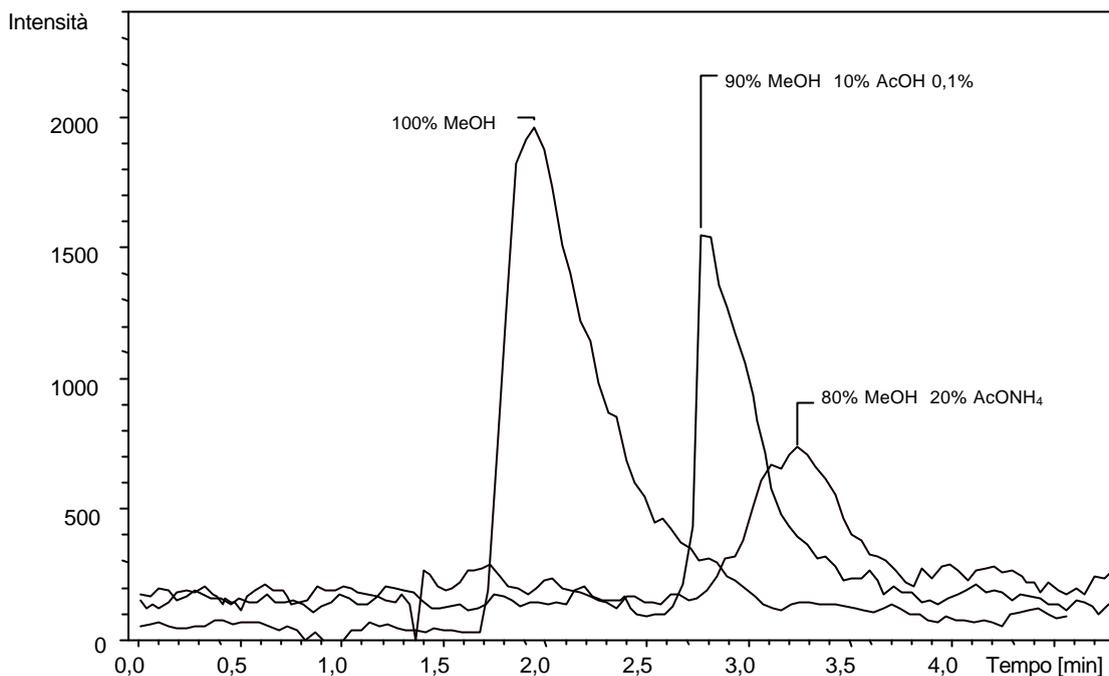
L'asimmetria dei picchi deriva da numerosi fattori (49), come un cattivo impaccamento della colonna, di cui ci si può rendere conto iniettando composti neutri, che dovrebbero dare picchi simmetrici. Oppure ci possono essere impurezze presenti nella matrice e che vengono fortemente ritenute dalla colonna, in questo caso si aggiunge una pre-colonna e si tenta di eliminare composti interferenti mediante spurgo della colonna con una fase organica forte. Altre possibili motivazioni all'asimmetria dei picchi si possono ricercare in un carico eccessivo di iniezione, in impurezze che sporcano od otturano i *frit*, in una fase mobile non adeguata all'eluizione del composto. Oltre a volumi di iniezioni troppo elevati (dovrebbero essere <25  $\mu$ l), anche tubi di connessione troppo lunghi o con diametri troppo grandi (in pratica, dovrebbero essere <20 cm, con diametro interno di 0,18 mm possono comportare scodature dei picchi cromatografici. Un'altra causa dell'asimmetria dei picchi è dovuta alla presenza di metalli contaminanti (Fe, Al, Ni, ecc.), che saturano i siti attivi della colonna (questo inconveniente può essere ovviato utilizzando supporti di silice altamente purificati).

Nel nostro caso i volumi iniettati sono piuttosto bassi (5  $\mu$ l), i tubi di connessione sono <20 cm) e con diametro interno di 0,13 mm, la colonna è costituita da silice purificata, inoltre le analisi sono sempre state fatte in presenza di *frit* e precolonna.

Quindi, si è continuato nell'approfondimento della ricerca di una fase mobile adeguata per l'eluizione dell'S-PMA. È stato anche aumentato il flusso delle pompe HPLC, portandolo a 0,3 ml/min, ma il picco cromatografico è sensibilmente peggiorato.

Per aumentare la stabilità dell'analita in soluzione nella sua forma acida, favorendo così la sua interazione con la colonna, è stata utilizzata la soluzione acquosa di acido acetico 0,1%.

L'isocratica al 90% di metanolo e 10% di acido acetico 0,1% risulta essere la più soddisfacente, come si può vedere dalla Figura 25, in quanto comporta un restringimento della base del picco, che dura circa un minuto, ma anche un abbassamento di intensità di circa la metà rispetto al 90% metanolo e 10% acqua. Inoltre il picco cromatografico risulta essere ancora scodato.

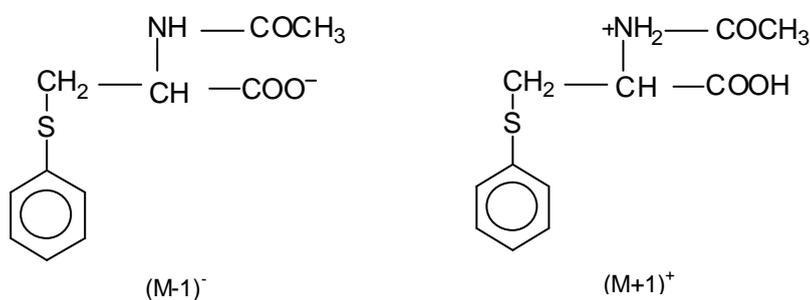


**Figura 25. Massa 238; ionizzazione negativa: cromatogrammi dello standard S-PMA 500 pg iniettati, varie isocratiche tra MeOH e AcOH 0,1%**

L'isocratica al 90% di metanolo e 10% di acido acetico 0,1% è stata provata anche in positivo, il picco cromatografico risultante è più intenso di un ordine di grandezza (l'acido oltre a migliorare la cromatografia, in positivo incrementa la formazione di ioni positivi dell'analita).

Poiché entrambi le fasi mobili non hanno dato risultati completamente soddisfacenti, si è esplorato l'utilizzo di una soluzione di acetato di ammonio; la scelta di questo tampone è stata fatta considerando la volatilità di questo sale, rispetto a un altrettanto efficace tampone (il fosfato, ad esempio), che, non essendo altrettanto volatile, può dare problemi di deposito durante la fase di evaporazione del solvente. Inoltre, come è stato precedentemente notato, in modalità positiva, l'acetato di ammonio previene la formazione di addotti sodici con l'analita.

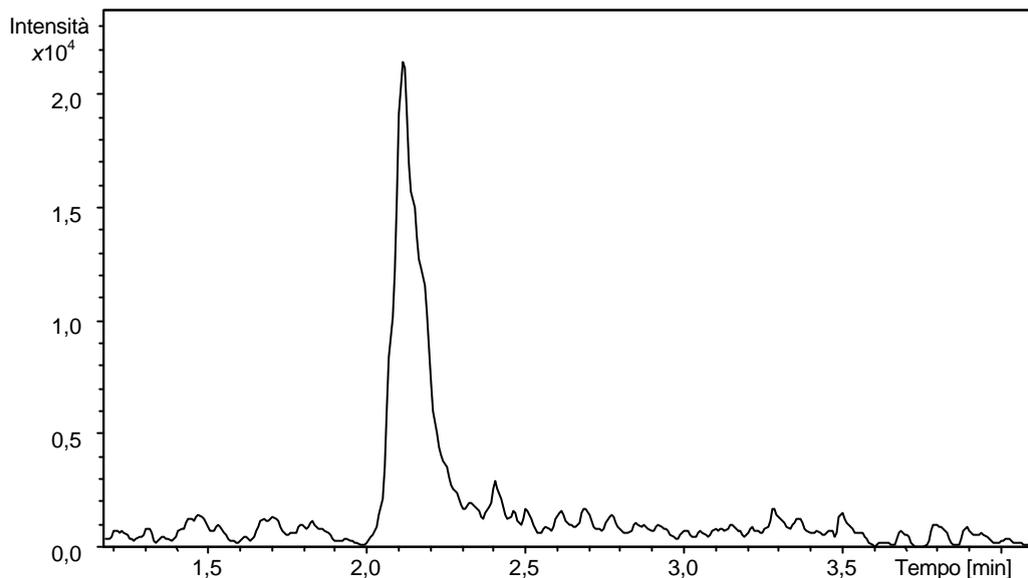
Anche in questo caso si sono seguite le masse  $(M-1)^- = 238$  m/z, per la polarità negativa, e la  $(M+1)^+ = 240$  m/z, per la polarità positiva (Figura 26).



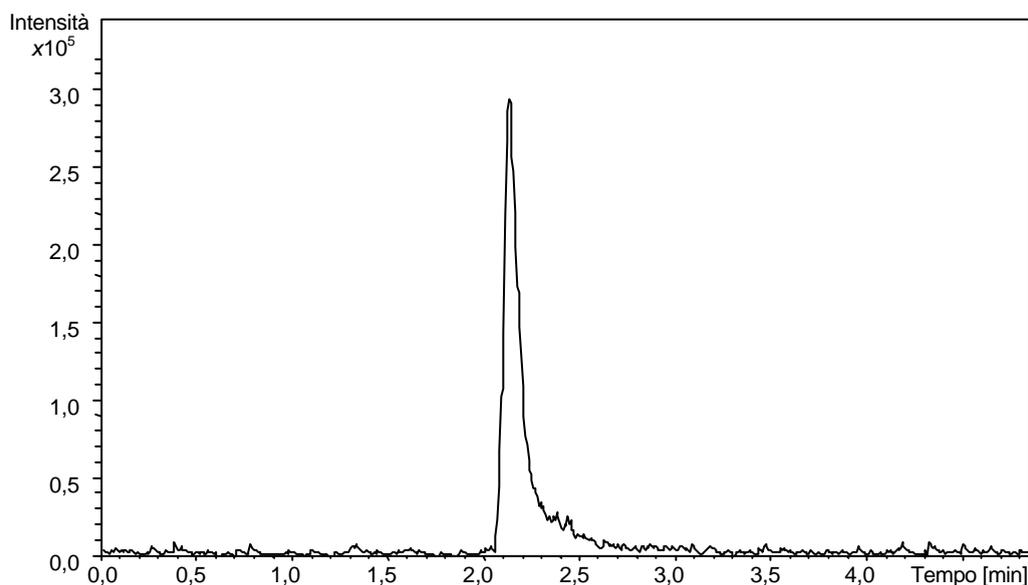
**Figura 26. Formule di struttura degli ioni  $(M-1)^-$  e  $(M+1)^+$  dell'S-PMA**

In scansione, i cromatogrammi relativi alle due masse mostrano picchi cromatografici simmetrici, che durano circa 40 secondi, ma in modalità positiva il picco risulta più intenso di un ordine di grandezza rispetto a quello in polarità negativa.

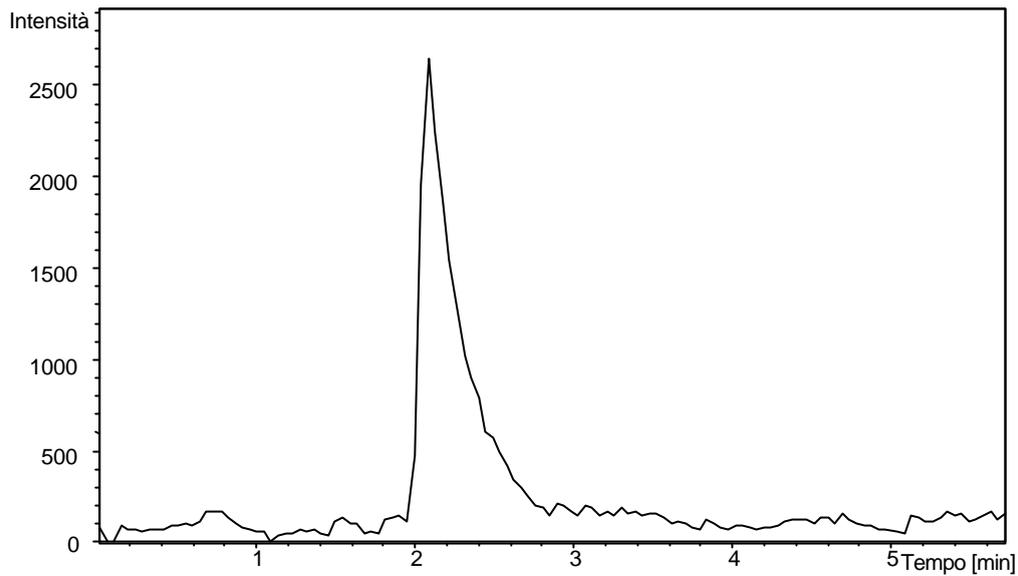
In isolamento, pur utilizzando le stesse condizioni sperimentali e il medesimo standard, l'intensità dei picchi diminuisce di un ordine di grandezza in entrambe le modalità, scodando evidentemente, benché permanga la differenza, in valore assoluto, già segnalata in scansione (Figure 27, 28, 29 e 30). Comunque i risultati sono migliori di quelli ottenuti con metanolo e acqua.



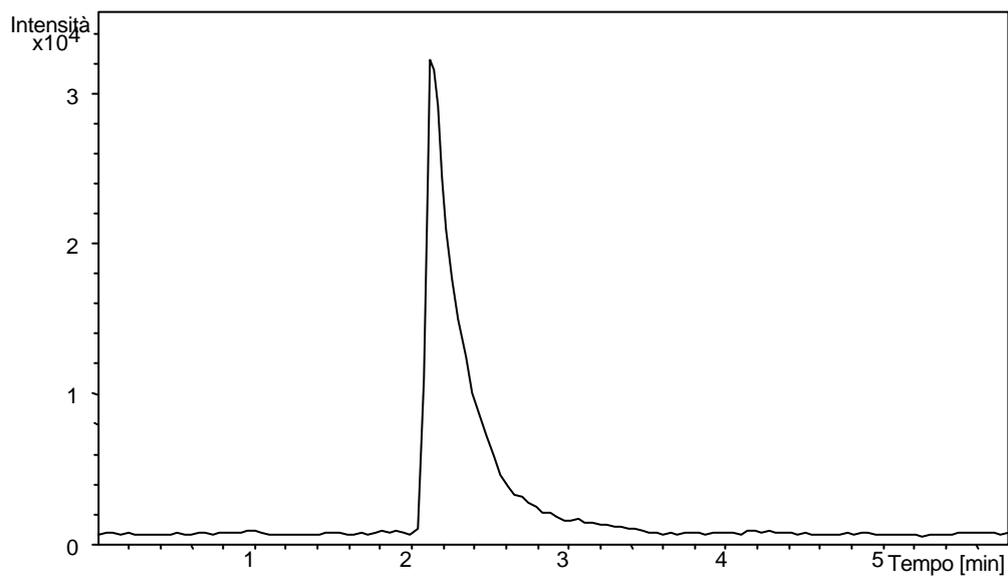
**Figura 27. Massa 238; scansione negativa: cromatogramma dello standard S-PMA 500 pg iniettati; 90% MeOH e 10% AcONH<sub>4</sub>**



**Figura 28. Massa 240; scansione positiva: cromatogramma dello standard S-PMA 500 pg iniettati; 90% MeOH e 10% AcONH<sub>4</sub>**



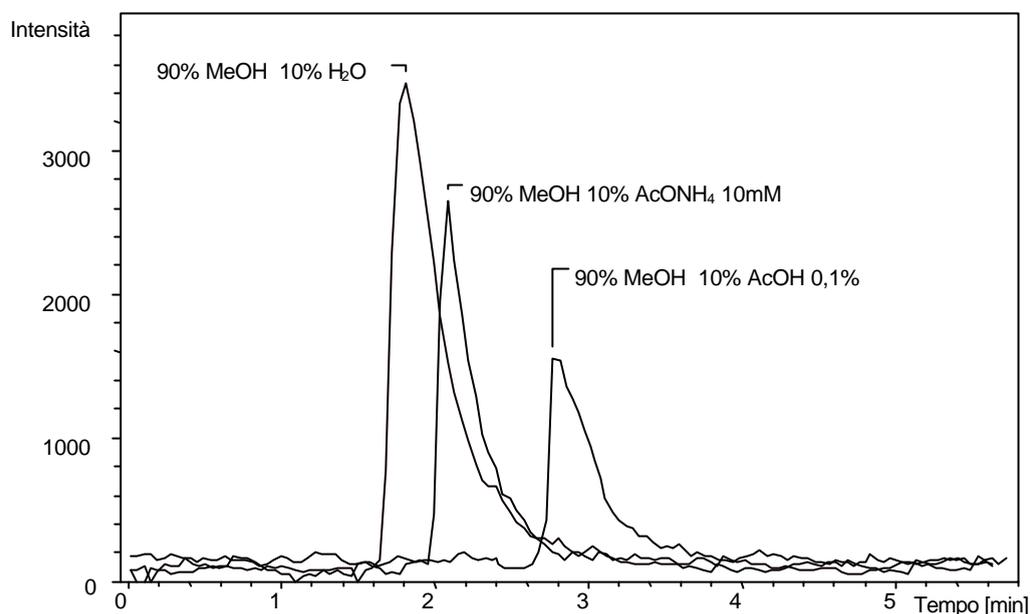
**Figura 29. Massa 238; isolamento negativo: cromatogramma dello standard S-PMA 500 pg iniettati; 90% MeOH e 10% AcONH<sub>4</sub>**



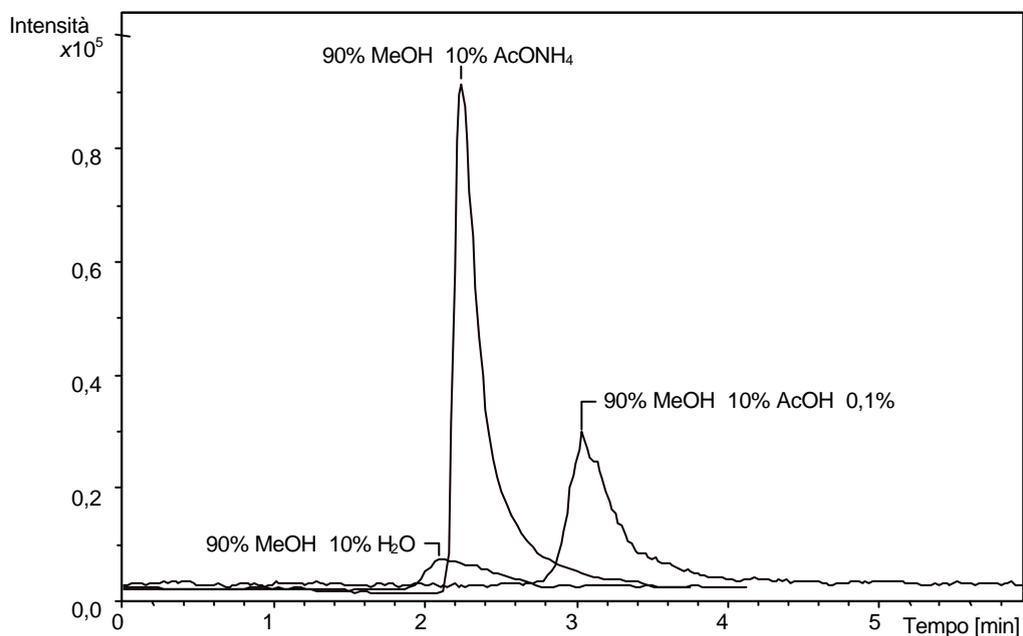
**Figura 30. Massa 240; isolamento positivo: cromatogramma dello standard S-PMA 500 pg iniettati; 90% MeOH e 10% AcONH<sub>4</sub>**

In conclusione, tra le varie prove effettuate con le differenti fasi mobili, i risultati migliori si sono ottenuti utilizzando metanolo e acetato di ammonio; questa fase mobile è stata utilizzata per le analisi condotte sul campione reale. L'eluizione per il campione reale non avviene in isocratica, ma in gradiente lineare, come riportato nella parte sperimentale, per migliorare la separazione dell'analita dai numerosi composti ancora presenti nell'estratto purificato di urina.

Nelle Figure 31 e 32 sono riuniti i risultati migliori ottenuti nelle prove effettuate per la ricerca della fase mobile, sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa.



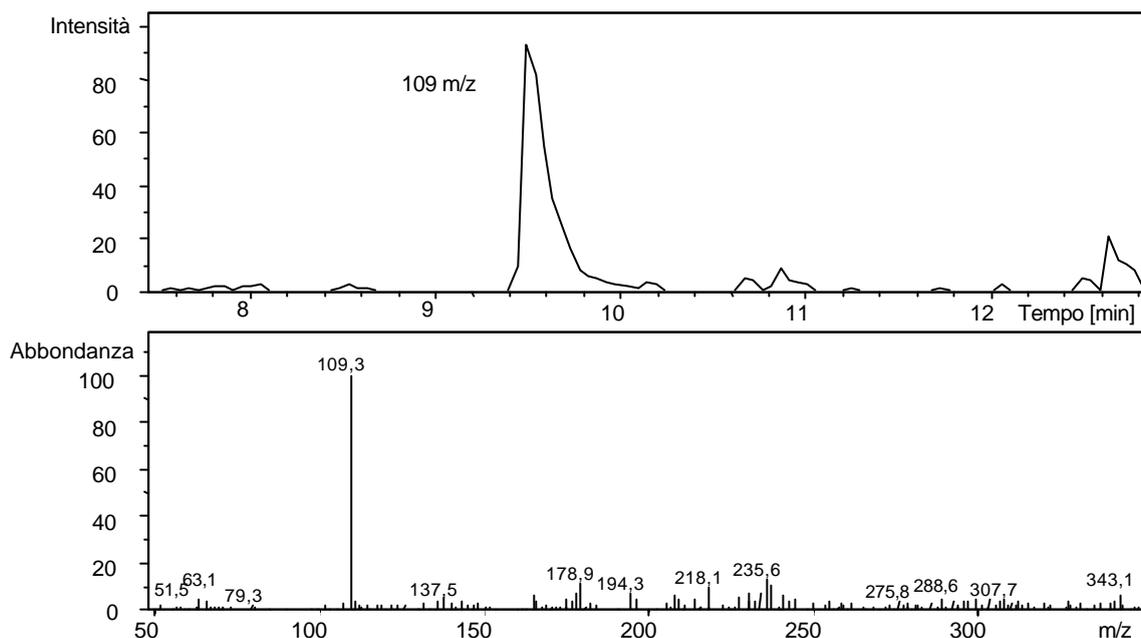
**Figura 31. Massa 240; isolamento positivo: cromatogramma degli standard S-PMA 500 pg iniettati, isocratiche MeOH e H<sub>2</sub>O/ AcONH<sub>4</sub>/ AcOH**



**Figura 32. Massa 238; isolamento negativo: cromatogramma degli standard S-PMA 500 pg iniettati, isocratiche MeOH e H<sub>2</sub>O/ AcONH<sub>4</sub>/ AcOH**

## Analisi di un campione di urina

Il campione di urina descritto è stato analizzato con il metodo così messo a punto, dotando la colonna di *frit* e precolonna e utilizzando un gradiente lineare di eluizione in cui la fase mobile è costituita da metanolo e acetato di ammonio. Il programma di eluizione è riportato nella parte sperimentale. In scansione, l'analita eluisce dopo 9,5 min. Analogamente a quanto eseguito per lo standard, anche il campione è stato analizzato sia in modalità negativa che positiva. Anche in questo caso l'intensità del segnale in modalità negativa è la più bassa, come si può osservare dalla Figura 33 che riporta il cromatogramma e il corrispondente spettro della massa 109, prodotto di frammentazione della massa 238.



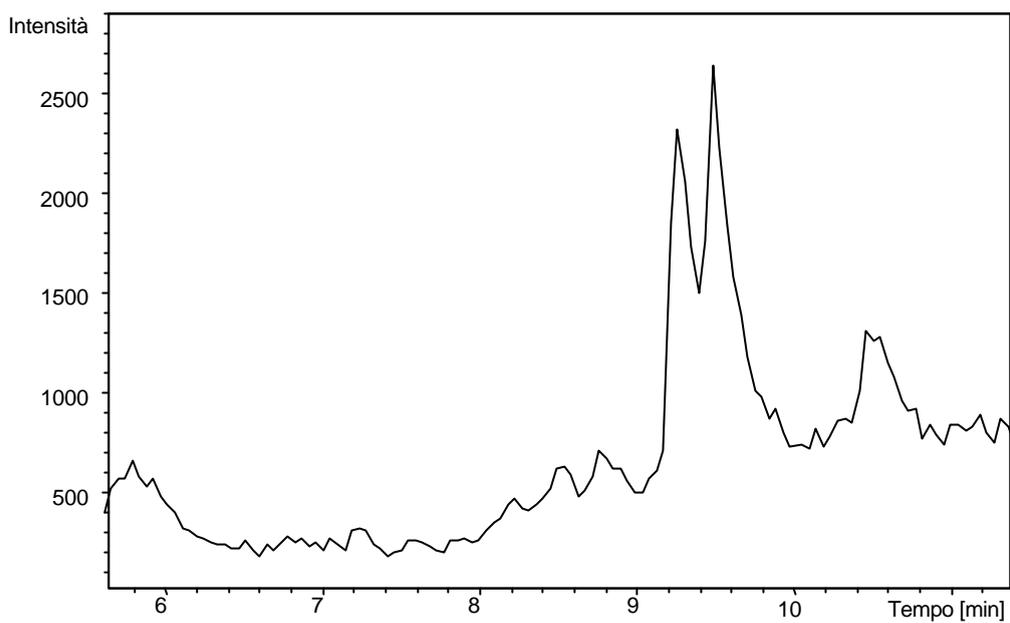
**Figura 33. Prodotto della frammentazione negativa della massa 238: cromatogramma del campione reale (in alto) e lo spettro corrispondente al picco (in basso)**

Lo stesso campione è stato analizzato in ionizzazione positiva, sia in scansione sia in isolamento che in massa/massa.

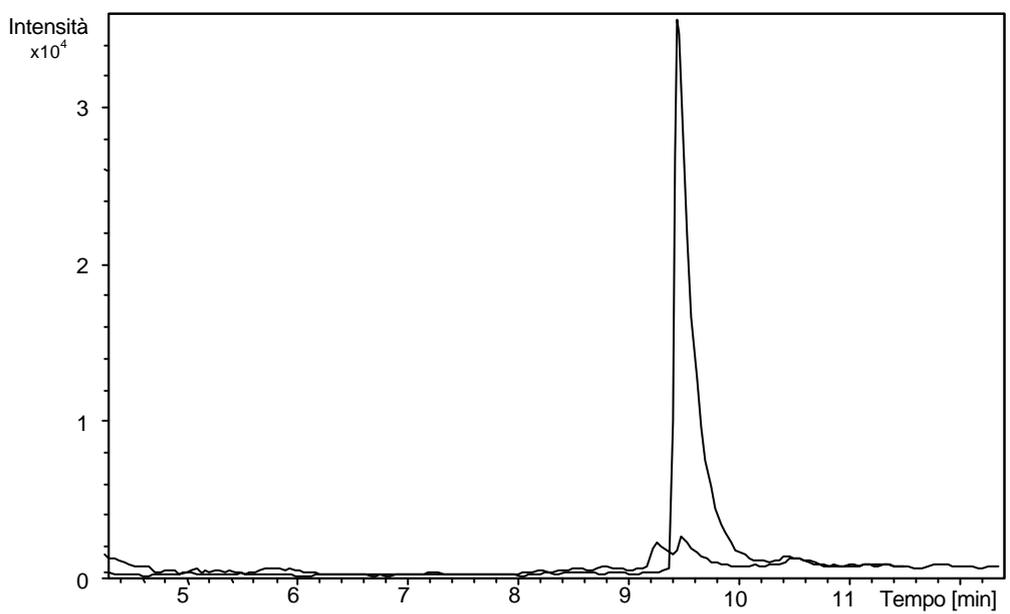
Durante l'analisi del campione reale, in isolamento, seguendo quindi la traccia cromatografica della massa  $240 \text{ m/z} = (M+1)^+$ , due picchi, poco risolti, sono presenti in prossimità del tempo di ritenzione dello standard di S-PMA (Figura 34).

La sovrapposizione del relativo cromatogramma con quello di uno standard concentrato di S-PMA (circa 1 ng iniettato), non ha permesso la certa identificazione dell'analita (Figura 35).

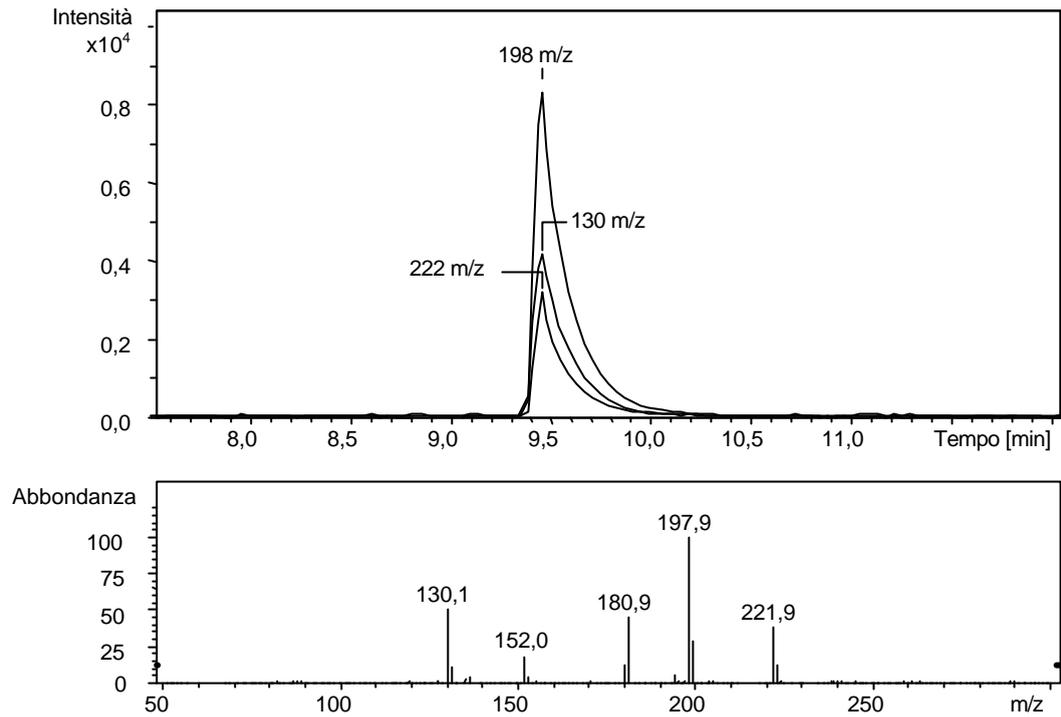
Per ovviare a questo inconveniente e per aumentare la specificità del metodo, si può effettuare la massa/massa; questa operazione comporta, infatti, la frammentazione degli ioni  $240 \text{ m/z}$ , isolati nello step precedente. A questo punto soltanto gli ioni  $240 \text{ m/z}$  provenienti dall'analita produrranno la sua specifica frammentazione ( $m/z$  222, 298, 130), mentre gli ioni interferenti daranno una differente frammentazione. A tale proposito si osservino i cromatogrammi nelle Figure 36 e 37.



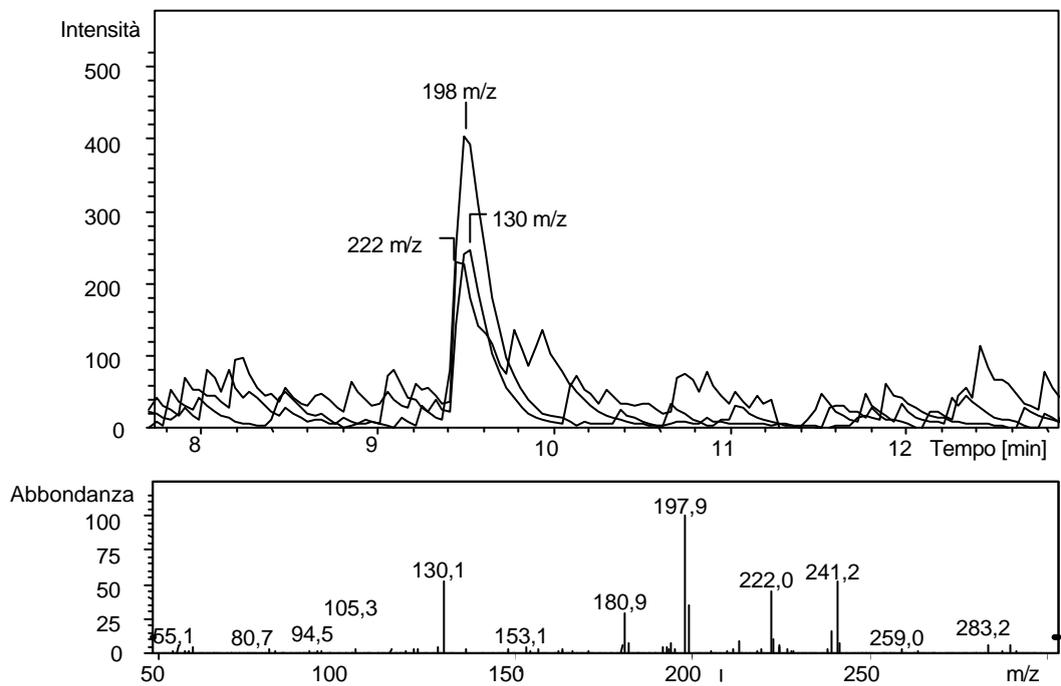
**Figura 34. Massa 240; isolamento positivo: cromatogramma del campione reale**



**Figura 35. Massa 240; isolamento positivo: cromatogramma dello standard di S-PMA di 1 ng (quella con un unico picco) e del campione reale**



**Figura 36. Prodotti di frammentazione positiva della massa 240:  
cromatogramma di standard S-PMA 1 ng iniettato**



**Figura 37. Prodotti di frammentazione positiva della massa 240:  
cromatogramma del campione reale**

La frammentazione dell'S-PMA genera i seguenti ioni: 222 m/z, 198 m/z, 130 m/z.

Lo ione 198 m/z è risultato essere il più intenso, perciò è stato utilizzato per l'analisi quantitativa.

La presenza di più frammenti dell'analita rappresenta un notevole vantaggio, in termini di specificità e identificazione della sostanza rispetto alla polarità di ionizzazione negativa, dove un unico frammento (109 m/z) si origina dallo ione (M-1).

I picchi cromatografici, in positivo, sono più intensi di quelli in negativo: in scansione, di un ordine di grandezza. Inoltre qualitativamente, è preferibile una frammentazione in più ioni figlio, per una più specifica identificazione dell'analita.

Perciò l'analisi quantitativa e la caratterizzazione delle prestazioni del metodo sono state eseguite operando in modalità positiva.

Dato che i parametri sono stati ottimizzati con concentrazioni elevate, si è ritenuto di ripetere le ottimizzazioni più prossime a quelle reali. A questo scopo, sono stati ottimizzati i parametri della trappola ionica (*accumulation time*, *target*, *max accumulation time*) con la soluzione di 11,47 ng/μl, e con 229,36 pg/μl. Sono state fatte iniezioni dello standard di 229,36 pg/μl, in massa/massa, applicando i due diversi set di parametri.

L'intensità del segnale è aumentata con i parametri relativi allo standard di 229,36 pg/μl, e inoltre è migliorato anche il rapporto segnale rumore. Permane invece una scodatura dei picchi in isolamento e in frammentazione che si era ipotizzato essere causata da saturazione della trappola.

Per valutare ulteriori incrementi di sensibilità, i parametri dell'analizzatore sono stati ottimizzati anche per una soluzione standard di 22,94 pg/μl, quest'ultima è stata poi iniettata nel LC-MS con i parametri relativi allo standard di 11,468 ng/μl, e con quelli del 22,94 pg/μl. In questo caso non si sono riscontrati miglioramenti sia in termini di sensibilità, che di rapporto segnale/rumore.

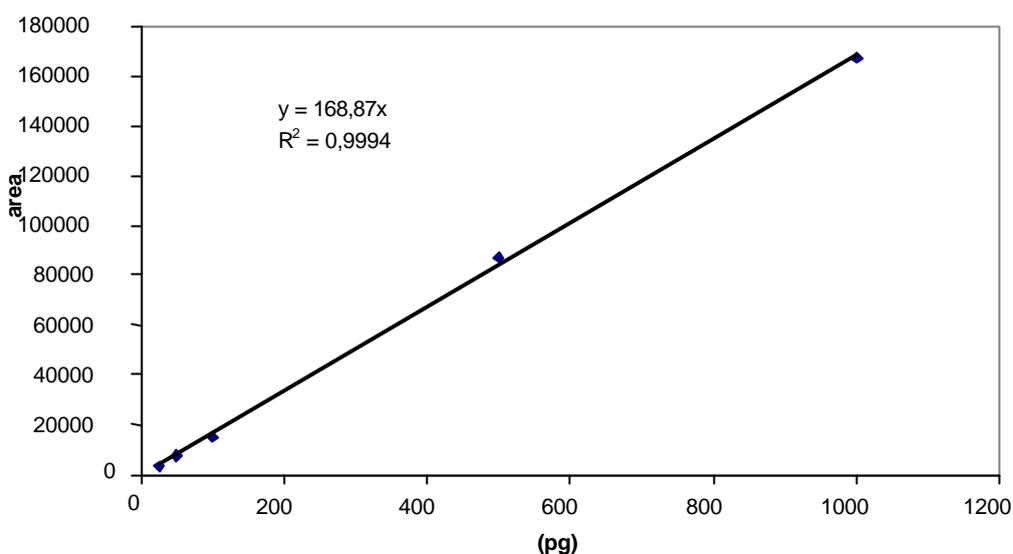
## Caratterizzazione delle prestazioni analitiche del metodo

Nonostante si disponesse di un solo campione reale a contenuto incognito di analita, la determinazione è stata comunque effettuata tramite una retta di taratura per caratterizzare più realisticamente le prestazioni del metodo.

È stata quindi determinata la retta di taratura per la quantificazione del campione reale; in Tabella 10 sono riportati i dati ottenuti per le cinque soluzioni; i punti sul grafico in Figura 38 rappresentano la media dei tre valori.

**Tabella 10. Dati per la costruzione della retta di taratura**

Quantità iniettata (pg)	Picco cromatografico			
	area 1	area 2	area 3	media
25	3189	2581	3815	3195
50	8158	6720	8821	7900
100	15008	17268	13330	15202
500	95530	86881	78872	87094
1000	160470	155300	187530	167767



**Figura 38. Retta di taratura**

Il campione reale è stato iniettato tre volte e le relative aree sono state introdotte nell'equazione della retta di taratura (Figura 38), ricavando così i tre seguenti valori per le quantità iniettate: 49,7 pg, 52,8 pg, 54,4 pg; esse sono state mediate ottenendo la quantità di 52,3 pg di S-PMA contenuta nel campione iniettato, dividendo poi per il volume del *loop* si ottiene la concentrazione nella soluzione, corrispondente a 10,46 pg/μl.

Quindi, il valore determinato di S-PMA contenuto nel campione reale è di 52,3 pg = 10,46 pg/μl con un coefficiente di variazione del 4,6% per le tre repliche. Tale valore è in accordo con la concentrazione media dell'S-PMA urinario presente in persone non esposte e pari a 0,004 mg/l (= 4 pg/μl) (54). Infatti, nel nostro caso, il volume finale dell'estratto trattato che viene iniettato è la metà di quello del campione di urina di partenza, per cui i 10,46 pg/μl nell'estratto corrispondono a 5,23 pg/μl nell'urina.

La curva di calibrazione dell'S-PMA è lineare in un intervallo di concentrazione 5-200 pg/μl, corrispondente a 25-1000 pg iniettati ( $R^2 = 0,9994$ ).

Rispetto alle soluzioni utilizzate per la calibrazione, sono stati anche esplorati livelli più bassi di concentrazione: lo standard a 1 pg/μl non è stato rivelato dallo strumento, mentre è distinguibile il segnale relativo alla concentrazione di 2 pg/μl, che corrisponde a 10 pg iniettati; tuttavia, poiché il picco cromatografico relativo è caratterizzato da un rapporto segnale/rumore (S/N) compreso tra 5:1 e 3:1, questa concentrazione non è stata inclusa nelle prove per la determinazione della retta di taratura, ma è stata considerata appena superiore al limite di rivelabilità (Limit Of Detection, LOD), con il quale si intende la più bassa concentrazione che un processo analitico possa rivelare con certezza, caratterizzata da un rapporto segnale/rumore maggiore o uguale a 3:1 (82).

La valutazione dell'accuratezza, intesa come stima della distanza tra valore sperimentale e valor vero (83), è stata effettuata, in mancanza di campioni certificati, per aggiunta di una quantità nota di standard al campione incognito: in tal modo è nota con esattezza la quantità di standard aggiunto mentre sono presenti tutte le possibili interazione di matrice e i composti interferenti di un campione reale.

Sono state prelevate due aliquote da 100 μl del campione reale: a una sono stati aggiunti 1146,8 pg di standard di S-PMA in 10 μl di metanolo, all'altra 10 μl di metanolo, ottenendo due

soluzioni di cui la prima ha una concentrazione aggiunta di  $1147/110=52,13$  pg/ $\mu$ l di S-PMA rispetto alla seconda.

Le due soluzioni sono state iniettate. Nello stesso tempo una terza soluzione da 11,47 pg/ $\mu$ l (57,35 pg complessivi) di standard di S-PMA è stata iniettata per la determinazione del fattore di risposta (Fr), definito come rapporto tra la risposta strumentale, l'area e la corrispondente quantità iniettata.

Si è operato in tal modo, invece che con la retta di taratura come in precedenza, per semplicità operativa, determinando il fattore di risposta attraverso un solo punto; infatti il metodo è stato dimostrato essere lineare nell'intervallo 25-1000 pg iniettati e la differenza di quantità iniettata varia, per le tre soluzioni analizzate, solo di un fattore 2 dato che è stata aggiunta una quantità di standard tale da raddoppiare la concentrazione del campione incognito già determinato.

Ogni soluzione è stata iniettata due volte e le aree così risultanti sono state mediate, ottenendo risultati visibili nella Tabella 11.

**Tabella 11. Risultati ottenuti per la prova di aggiunta**

Soluzione iniettata	Picco cromatografico		
	area 1	area 2	media
Standard di S-PMA 50 pg	7878	6645	7262
Campione + aggiunta di standard	15235	15689	15462
Campione + metanolo	8723	8143	8433

Usando la definizione di Fr si ricavano le quantità di analita iniettate:

$$Fr = \text{area}/\text{quantità iniettata} = 7262/57,35$$

Per un campione in cui la quantità iniettata "x" sia incognita:

$$x = \text{areax}/Fr$$

da cui:

$$x \text{ nel campione+ aggiunta di standard} = 15462/Fr = 122,10$$

$$x \text{ nel campione + metanolo} = 8433/Fr = 66,60$$

per differenza si trova la quantità di analita aggiunta:

$$[122,10 - 66,60] \text{ pg} = 55,50 \text{ pg}$$

Quindi la determinazione strumentale della quantità di standard di S-PMA aggiunta al campione reale ha dato il risultato di 55,50 pg.

Questo valore è vicino al teorico (52,13 pg); la differenza è del 6,46%. Certamente questa è solo una stima approssimata dell'accuratezza del metodo: tuttavia, in mancanza, ad esempio, di campioni certificati o della possibilità di eseguire un'analisi dello stesso campione con un metodo di riferimento validato, la prova effettuata è sicuramente un valido indicatore dell'accuratezza del metodo.

La misura della precisione, espressa come accordo tra i risultati di due o più misure ripetute e condotte nello stesso modo (83), è stata effettuata mediante 5 iniezioni replicate del campione reale e utilizzando lo stesso Fr sopra determinato.

I dati relativi a questa verifica sono riportati in Tabella 12.

**Tabella 12. Risultati di 5 repliche sul campione**

Replica	1	2	3	4	5	media	CV
Pg	61,83	54,61	57,50	58,85	57,04	57,97	4,57%

Il coefficiente di variazione sopra calcolato indica una buona precisione del metodo ed è in ottimo accordo con quello (4,6%) misurato nella determinazione tramite retta di taratura.

Anche il valore della quantità iniettata (57,97 pg) è in buon accordo con quello determinato precedentemente tramite retta di taratura (52,3 pg).

## Confronto delle prestazioni tra metodi in letteratura

Jongeneelen *et al.* nel 1987 (75) hanno sviluppato un metodo per la determinazione dell'S-PMA utilizzando un HPLC, UV a 256 nm, e trovando un LOD di 6 pg/ $\mu$ l, tuttavia i cromatogrammi HPLC-UV di estratti urinari, specialmente in soggetti fumatori, contengono diverse sostanze che possono coeluire, interferendo con la misura del composto in esame (76).

Maestri *et al.* (84) hanno effettuato una determinazione di S-PMA con un HPLC con rivelatore a fluorescenza, preceduta da derivatizzazione con o-ftalaldeide e 2-mercaptoetanololo; il LOD di questo metodo è di 0,5 pg/ $\mu$ l. Anche Einig e Dehnen (56) hanno utilizzato la stessa tecnica strumentale, preceduta da derivatizzazione; il limite di rivelabilità è risultato di circa 1 pg/ $\mu$ l.

Kivistö *et al.* (57) hanno messo a punto un metodo mediante HPLC, con rivelatore a fluorescenza, derivatizzando con la stessa procedura di Maestri *et al.* (3) e utilizzando come standard interno l'acido S-benzilmercapturico; il LOD risultante è 0,6 pg/ $\mu$ l.

Fino ad anni recenti la determinazione dell'S-PMA, mediante spettrometria di massa, veniva fatta esclusivamente per gas cromatografia (GC-MS), derivatizzando l'analita per renderlo volatile, come illustrato di seguito.

Stommel *et al.* (54) hanno determinato, derivatizzandolo, l'S-PMA mediante GC-MS, ottenendo un LOD di circa 1 pg/ $\mu$ l. Variando il metodo di Stommel *et al.*, van Sittert *et al.* (4) hanno sviluppato un metodo per GC-MS con derivatizzazione dell'S-PMA in acido S-benzilmercapturico con un LOD di 1-5 pg/ $\mu$ l. Boogard *et al.* (55) hanno elaborato un metodo con standard interno deuterato, che ha consentito un LOD di 1 pg/ $\mu$ l.

Melikian *et al.* (76) hanno analizzato l'S-PMA mediante LC-MS (utilizzando una sorgente elettrospray e un analizzatore a triplo quadrupolo: LC-ES-MS/MS), trovando come limite di rivelabilità, per soluzioni standard di S-PMA, 20 pg per iniezione con un rapporto segnale/rumore 5:1, mentre per quanto riguarda i campioni di urina il LOD è di 80 pg per iniezione.

Confrontando i limiti di rivelabilità dei metodi presenti in letteratura con il metodo analitico qui riportato, si può notare che le determinazioni gas cromatografiche sono caratterizzate da limiti paragonabili a quello ottenuto in questo studio (1-5 pg/ $\mu$ l) (4, 55, 68).

Le analisi dell'S-PMA mediante HPLC-fluorescenza e mediante gas-cromatografia, sono accomunate dalla necessità di derivatizzazione dell'analita: nel primo caso per renderlo fluorescente, nel secondo per diminuirne la polarità. La prima tecnica mostra in genere una migliore sensibilità (1-1,5 pg/ $\mu$ l) rispetto alla seconda. Ciò comporta, rispetto al metodo

presente, svantaggi sia per quanto riguarda il tempo che per la semplicità dell'analisi, perché i processi di derivatizzazione richiedono in genere procedimenti laboriosi.

Va considerato che il limite di rivelabilità del presente metodo (2 pg/μl, con un *loop* di 5 μl) può essere ulteriormente diminuito, utilizzando un *loop* di iniezione di maggiore volume (la colonna qui utilizzata può sopportare un carico fino a 20 μl). Infatti, con un *loop* di 20 μl, il limite si abbasserebbe a circa 0,5 pg/μl e quindi il metodo in oggetto può superare, in sensibilità, i citati metodi gas cromatografici e paragonarsi a quelli che impiegano la fluorescenza. Va infatti considerato che il LOD assoluto di 10 pg iniettati è, confrontato con i metodi basati su HPLC, sicuramente di rilievo. Spesso infatti la letteratura riporta, per questi metodi, il LOD in termini di concentrazione omettendo di specificare il volume iniettato. Il confronto con il metodo di Melikian *et al.* (76), il più omogeneo a quello in esame, è favorevole: infatti il metodo sviluppato in questa trattazione è caratterizzato da un limite di rivelabilità inferiore rispetto a quello che utilizza il triplo quadrupolo (76). Infatti il limite di Melikian *et al.* per soluzioni standard è di 20 pg iniettati, mentre nel nostro caso è di 10 pg; un ulteriore guadagno in sensibilità si ha nel campione reale, il cui limite è stato fissato da Melikian *et al.* a 80 pg iniettati di S-PMA, mentre in questo studio è stato determinato sperimentalmente un valore di 52,3 pg in un campione reale ed è ragionevolmente presumibile che si possano determinare concentrazioni inferiori e vicine al LOD determinato per soluzioni di standard (10 pg): infatti il CV per le 5 prove di precisione è stato del 4,6%; per le tre iniezioni con retta di taratura del 4,6%. L'elevata precisione del metodo a livelli di campione reale contenente circa 50 pg indica che questo valore è probabilmente lontano dal LOD perché è noto che in sua prossimità il CV è molto più elevato.

La maggiore sensibilità del metodo qui riportato rispetto a quello sviluppato da Melikian *et al.* può essere ricondotta alla differente polarità di ionizzazione del composto; infatti, l'acido S-PMA viene analizzato con il triplo quadrupolo ionizzando negativamente l'analita e determinando l'unico ione, di massa 109, proveniente dalla sua frammentazione. In questo caso, invece l'analisi è stata condotta mediante ionizzazione positiva, perché quella negativa ha mostrato una sensibilità minore; anche l'uso del tampone acetato d'ammonio ha migliorato la resa ionica; infine, in positivo lo spettro di frammentazione risulta essere sensibilmente diverso: sono presenti più frammenti, che identificano più univocamente la sostanza, dei quali lo ione di massa 198 risulta più abbondante e per questo motivo è stato selezionato per le analisi quantitative. Un ulteriore vantaggio, in termini di sensibilità, sta nel basare il metodo su uno ione a massa relativamente elevata (198 m/z), che risente di minori interferenze di uno a massa minore (109 m/z).

In conclusione, il metodo qui sviluppato, per la determinazione dell'S-PMA, metabolita urinario del benzene, risulta preciso, accurato e sensibile, nel confronto con altre tecniche analitiche emerge per la semplicità operativa e la velocità di analisi (rispetto alla gas cromatografia e la HPLC fluorescenza), e per la sensibilità e minor costo strumentale rispetto al LC-ES-MS/MS equipaggiato con un triplo quadrupolo.

## CONCLUSIONI

In questo studio è stato sviluppato un metodo analitico per la determinazione dell'acido 2-acetilammino-3-fenilsulfanil-propionico (più comunemente detto acido S-fenilmercapturico, S-PMA), mediante LC-MS; è caratterizzato da elevata precisione e da un'accuratezza che, sebbene sia stato possibile stimare solo attraverso un'aggiunta di standard, appare soddisfacente.

La sua sensibilità permette di rilevare anche casi di esposizione a benzene a livelli ambientali e il confronto con altre tecniche analitiche è risultato favorevole.

Infatti, la determinazione attraverso LC-MS con trappola ionica mostra una sensibilità paragonabile alla fluorescenza con derivatizzazione, superiore alla gas cromatografia, sempre con derivatizzazione, e superiore anche a una tecnica analoga che impiega un LC-MS equipaggiato con un triplo quadrupolo. Quindi, il metodo qui sviluppato emerge per la semplicità operativa e la velocità di analisi (rispetto alla gas cromatografia e l'HPLC fluorescenza), e per la sensibilità e minor costo strumentale rispetto al LC-ES-MS/MS equipaggiato con un triplo quadrupolo.

La sensibilità strumentale del metodo messo a punto, può essere attribuita a diversi fattori:

- specifica messa a punto dei parametri dell'interfaccia e della trappola ionica sulla molecola dell'analita nelle concentrazioni e condizioni di flusso ed eluente di interesse analitico: questo ha permesso di massimizzare in maniera esaustiva il segnale;
- uso del tampone acetato di ammonio: di fatto, ciò ha permesso una migliore simmetria del picco cromatografico e soprattutto una migliore risposta strumentale (l'acetato d'ammonio migliora considerevolmente l'efficienza di ionizzazione dell'analita);
- uso della frammentazione aumenta notevolmente la specificità della determinazione innalzando il rapporto S/N. Questo avviene, rispetto ad uno spettro in scansione o in isolamento, attraverso una riduzione di entrambi i termini del rapporto, ma in maniera più marcata per il rumore, in particolare quello a basse masse. In questo senso l'uso per la determinazione di uno ione figlio di una massa più elevata ( $m/z$  198) in ionizzazione positiva rispetto alla negativa ( $m/z$  109) costituisce un ulteriore vantaggio.

Allo scopo di approfondire questa tecnica analitica sono in progetto ulteriori studi con campioni reali, attinenti a esposizioni ambientali a benzene.

## BIBLIOGRAFIA

1. IARC. *Benzene, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of the Chemicals to Human*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1982.
2. ACGIH. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices for 1996/97*. Cincinnati (OH): American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 1997.
3. Maestri L, Ghittori S, Grignani E, Fiorentino ML, Imbriani M. Dosaggio di un metabolita del benzene l'acido S-Fenilmercapturico urinario (S-PMA), nell'uomo, mediante HPLC. *Med Lav* 1993;84(1):55-65.
4. Van Sittert NJ, Boogard PJ, Beulink GDJ. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low level of exposure to benzene in industry. *Br J Ind Med* 1993;50:460-69.
5. Sneyder R, Lee E W, Kocsis JJ, Witmer CM. Bone Marrow Depressant and leukemogenic action of benzene. *Life Sci* 1977;21:1709-13.
6. Goldstein BD, Snyder CA, Laskin S, Bromberg I, Albert RE, Nelson N. Myelogenous leukemia in rodents inhaling benzene. *Toxicol Lett* 1982;13:169-73.
7. Savitz DA, Andrews KW. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Ind Med* 1997;31:287-95.
8. Hayes RB, Dosemeci M, Wacholder S, Travis LB, Rothman N, Hoover RN, Linet MS, Yin S-N, Li G-L. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasm in China. *J Nat Cancer Institute* 1997;89:1065-71.
9. Andrews LS, Snyder R. Toxic effects of solvents and vapors. In Casarett LJ, Doull J (Ed.). *Toxicology: the basic science of poisons*. 3 ed. New York: Mc Millan Ed; 1986. p. 641.
10. Marcus WL. Chemical of current interest: benzene. Cancer risk from benzene. *Adv Mod Environ Toxicol* 1990; 17:127-88.
11. EPA. *Carcinogenic effects of benzene: an update, 1998*. Washington: Environmental Protection Agency; 1998. (EPA/600/P-97/001F).
12. Wilson RH. Benzene poisoning in industry. *J Lab Clin Med* 1942;27:1517-21.
13. Aksoy M, Dincol K, Erdem S, Dincol G. Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. *Br J Ind Med* 1971;28:296-302.
14. Paci E, Buiatti E, Costantini AS, Miligi L, Pucci N, Scarpelli A, Petriolo G, Simonata L, Winkelmann R, Kaldor JM. Aplastic anemia, leukemia and other cancer mortality in a cohort of shoe workers exposed to benzene. *Scand J Work Environ Health* 1989;15:313-18.
15. Yin S-N, Li G-L, Tain F-D, Fu Z-I, Jin C, Chen Y-J, Luo S-J, Ye P-Z, Zhang J-Z. Leukemia in benzene workers: a retrospective cohort study. *Br J Ind Med* 1987;44:124-8.
16. Kipen HM, Cody RP, Goldstein RP. Use of longitudinal analysis of peripheral blood counts to validate historical reconstructions of benzene exposure. *Environ Health Perspect* 1989;82:199-206.
17. Snyder CA, Goldstein BD, Sellakumar A, Bromberg I, Laskin S, Albert RE. The inhalation toxicology of benzene: incidence of hematopoietic neoplasm and hematotoxicity in AKR/J and C57BL/6J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;54:323-31.
18. Goldstein BD. Metabolism and toxicity of trans,trans-Muconaldehyde, an Open-Ring Microsomal Metabolite of benzene. *Environ Health Persp* 1989;82:3-6.

19. Lunte SM, Kissinger PT. Detections and identification of sulphhydryl conjugates of p-benzoquinone in microsomal incubations of benzene and phenol. *Chem Biol Interact* 1983;47:195-212.
20. Tough IM, Court Brown WM. Chromosome aberrations and exposure to ambient benzene. *Lancet* 1965;1:684.
21. Pollini G, Biscaldi GP, Robustelli G. Chromosome changes in lymphocytes five years after benzene haemopathy. *Med Lav* 1969;60:743-58.
22. Ungvary G, Tatrai E. On the embryotoxic effects of benzene and its alkyl derivatives in mice, rats and rabbits. *Arch Toxicol* 1985;8:425-30.
23. Keller KA, Snyder CA. Mice exposed in utero to low concentration of benzene exhibit enduring changes in their colony forming hematopoietic cells. *Toxicol* 1986;42:171.
24. IARC. *Occupational exposures in petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1989.
25. Turrio Baldassarri L, Carere A, Fuselli S, Iavarone I, Lagorio S, Iacovella N. Carburanti autoveicolari come fonte di inquinamento da benzene. In: Frigerio A, Fardini F (Ed.). *Inquinanti atmosferici primari e secondari*. Milano: Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche editore; 1996.
26. Lagorio S, Iavarone I, Iacovella N, Fuselli S, Proietto AR, Turrio Baldassarri L, Carere A. Variability of benzene exposure among filling station attendants. *Occupational Hygiene* 1997;4:15-30.
27. Carere A, Fuselli S, Iacovella N, Iavarone I, Lagorio S, Proietto AR, Turrio Baldassarri L. *Variabilità dell'esposizione a benzene tra gli addetti all'erogazione carburanti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1996. (Rapporti Istisan 96/37).
28. Shan JJ, Singh HB. Distribution of volatile organic chemicals in outdoor and indoor air. A national VOCs data base. *Environ Sci Technol* 1988;22:1381-8.
29. Ogata M, Miyake Y. Disappearance of aromatic hydrocarbons and organic sulphur compounds from fish flesh reared in crude oil suspension. *Water Res* 1978;12:1041-4.
30. Hine J, Mookerjee PK. The intrinsic hydrophilic character of organic compounds. Correlation in terms of structural contributions. *J Org Chem* 1975;40:292-8.
31. Vaishnav DD, Babeu L. Comparison of occurrence and rates of chemical biodegradation in natural waters. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987;39:237-44.
32. Turrio Baldassarri L. Relazione in *Raccolta dei pareri espressi dalla Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale*, 1995, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
33. Cocheo V, Sacco P, Boaretto C, De Saeger E, Ballesta P, Skov H, Goelen E, Gonzalez N, Caracena A. Urban benzene and population exposure. *Nature* 2000;404:141-2.
34. Clini C, Lagorio S, Cocheo V, Minoia C. Il rischio benzene. I quaderni de Le Scienze 1999;109:48-57.
35. US EPA. *Ambient air benzene concentrations in 39 US cities, 1984-1986*. Washington: Environmental Protection Agency; 1987. (EPA/600/D-87/160).
36. Wallace LA, Pellizzari ED. Personal air exposures and breath concentrations of benzene and other volatile hydrocarbons for smokers and no smokers. *Toxicol Lett* 1986;35:113-6.
37. OSHA (Occupational Safety and Health Administration). *Occupational exposure to benzene*. Fed. Reg, 1987;52 (176): 34460-578.
38. NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. *Manual of analytical methods*. Cincinnati (OH): DHEW; 1997

39. WHO, World Health Organization. Environmental health criteria 150: Benzene. International Program on Chemical Safety (IPCS), 1993 Geneva.
40. Money CD, Gray CN. Exhaled breath analysis as a measure of workplace exposure to benzene ppm. *Ann Occup Hyg* 1989;33:257-62.
41. Yardley-Jones A, Anderson D, Parke DV. The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assesment. *Br J Ind Med* 1991;48:437-44.
42. Ong G-N, Lee B-L. Determination of benzene and its metabolites: application in biological monitoring of environmental and occupational exposure to benzene. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;660:1-22.
43. Angerer J, Horsch B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *J Chromatogr* 1992;580:229-55.
44. Bauer H, Dimitriadis EA, Snyder R. An *in vivo* study of benzene metabolite DNA adduct formation in liver of male New Zealand rabbits. *Arch Toxicol* 1989;63:209-13.
45. Creek MR, Vogel JS, Turteltaub KW. Extremely low dose benzene pharmacokinetics and macromolecular binding in B6C3F1 male mice. *The Toxicologist* 1994;14(1):430.
46. Lutz WK, Sclatter C. Mechanism of the carcinogenic action of benzene: irreversible binding to rat liver DNA. *Chem Biol Interact* 1997;18:241-5.
47. US NRC (US National Research Council). *Biological markers in reproductive toxicology*. Washington, DC: National Accademy Press; 1989.
48. WHO. *Environmental health criteria 155: biomarkers and risk assessment, concept and principles*. International Program on Chemical Safety (IPCS). Geneva, World Health Organization; 1993.
49. Snyder CA, Laskin S, Goldstein B. An extractive method for determination of benzene in blood by gas chromatography. *Am Industr Hyg Assoc J* 1975;33:283-7.
50. Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ. Practical HPLC method development. New York: Wiley Interscience Publication; 1997.
51. Daly JW, Jerina DM, Witkop B. The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compound. *Experientia* 1972;23:1129-31.
52. Inoue O, Seiji K, Watanabe T. Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man. *Occup Environ Health* 1988;60:15-20.
53. McMichael AJ. Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene: epidemiological and experimental evidence. In: Fishbein L, O'Neill IK (Ed.). *Environmental carcinogens: methods of analysis and exposure measurement*. Vol. 10: Benzene and alkilated benzenes. Lyon: IARC, 1988; p.3-18. ( IARC sci pub. No 85).
54. Stommel P, Müller G, Stucker W, Verkoyen C, Schöbel S, Norpoth K. Determination of S-phenylmercapturic acid in the urine an improvement in the biological monitoring of benzene exposure. *Carcinogenesis*. 1989;10(2):279-82.
55. Boogard PJ, Van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans, trans-muconic acid, and phenol. *Occup Environ Med* 1995;52:611-20.
56. Einig T, Dehnen W. Sensitive determination of the benzene metabolite S-phenylmercapturic acid in urine high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1995;697:371-75.
57. Ghittori S, Maestri L, Fiorentino ML, Imbriani M. Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int Arch Occup Envir Health* 1995;67:195-200.

58. Kivistö H, Pekari K, Peltonen K, Svinhufvud J, Veidebaum T, Sorsa M, Aitio A. Biological monitoring of exposure to benzene in the production of benzene and in a cokery. *Sc Tot Environ Health* 1997;199:49-63.
59. Fang MZ, Shin MK, Park KW, Kim YS, Lee JW, Cho MH. Analysis of urinary S-phenylmercapturic acid and trans,trans- muconic acid as exposure biomarkers of benzene in petrochemical and industrial areas of Korea. *Scand J Work Environ Health* 2000;26(1):62-6.
60. Latriano L, Goldstein BD, Witz G. Formation of muconaldehyde, an open-ring metabolite of benzene, in mouse liver microsomes: and additional pathway for toxic metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8356-60.
61. Inoue O, Seji K, Nakatsuka H, Watanabe T, Yin S-N, Li G-L, Cai S-X, Jin C, Ikeda M. Urinary t,t-muconic acid as an indicator of exposure to benzene. *Br J Ind Med* 1989;46:122-7.
62. Ducos P, Gaudin R, Robert A. 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* 1990;62:534.
63. Bechtold WE, Lucier G, Birnbaum LS, Yin SN, Li LG, Henderson RF. Muconic acid determinations in urine as a biological exposure index for workers occupational exposed to benzene. *Am Ind Hyg Assoc J* 1991;52:473-8.
64. Lee BL, New AL, Kok PW, Ong HY, Shi CY, Ong CN. Urinary trans,trans-muconic acid determined by liquid chromatography-application in biological monitoring of benzene exposure. *Clin Chem* 1993;39:1788-92.
65. Ducos P, Gaudin R, Bel J, Maire C, Francin JM, Robert A, Wild P. Trans, trans-muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:309-13.
66. Rupert T, Scherer G, Tricker AR, Adlkofer F. Trans,trans- muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;69:247-51.
67. Pezzagno G, Maestri L. The specific trans,trans- muconic acid as a biological indicator for low levels of environmental benzene. *Indoor Built Environ* 1997;6:12-8.
68. Nerland DE, Pierce WM. Identification of Nacetyl-S-(2,5-dihydroxyphenyl)-L-cysteine as a urinary metabolite of benzene, phenol and hidroquinone. *Drug Metab Dispos* 1990;18:958-61.
69. Boogard PJ, Van Sittert NJ. Suitability of S- phenylmercapturic acid and trans, trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. *Environ Health Persp* 1996;104 (suppl.6):1151-7.
70. Qu Q, Melikian AA, Li G, Shore R, Chen L, Cohen B, Yin S, Kagan MR, Li H, Meng M, Jin X, Winnik W, Li Y, Mu R, Li K. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites. *Am J Ind Med* 2000;37: 522-31.
71. Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing 14C-benzene. *Biochem J* 1953;54:231-8.
72. Jerina D, Daly J, Witkop B, Zaltman-Norenberg P, Undefriend S. Role of the arene oxide-oxepin system in the metabolism of aromatic substrates. In vitro conversion of benzene-oxide to a premercapturic acid and a dihydrodiol. *Arch Biochem Biophys* 1968;128:176-83.
73. ACGIH. *Threshold limit values for chemical sustances and physical agents and biological exposure indices for 1995/96*. Cincinnati (OH): American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 1996.
74. Deutsche Forschungsgemeinschaft. *List of MAK and BAT values*. Weinheim: Verlagchemie; 1997. (Report n. 33).

75. Jongeneelen FJ, Dirven HAAM, Leijdekker CM, Henderson PT. S-Phenyl-N-acetylcysteine in urine of rats and workers after exposure to benzene. *J Anal Toxicol* 1987;11:100-4.
76. Melikian AA, O'Connor R, Prahalad AK, Hu P, Li H, Kagan M, Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 1999;20(4):719-26.
77. Barceló D. Application of LC-MS in Environmental Chemistry. Elsevier. 1996; p.3-49.
78. Skoog DA, Leary JJ. *Chimica analitica strumentale*. Napoli:EdiSES. 1995.
79. Cole RB. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Fundamentals, instruction and application*. New York: Wiley & Sons Ed.; 1997.
80. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246: 64-71.
81. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. *Spectrometric identification of organic compound*. New York: Wiley and Sons, Inc.; 1991.
82. ACS Committee On Environmental Improvement. *Anal Chem* 1980; 52:2242-9.
83. Currie LA, Svehla G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. *Pure & Appl Chem* 1994; 3:595-608.
84. Maestri L, Mestad IJ, Pezzagno G. Mercapturati e monitoraggio biologico: benzene. *G Ital Med Lav Erg* 1999;21(4):323-8.

## APPENDICE

### Parametri per la determinazione dell'acido *trans,trans*-muconico

Il metabolita di riferimento maggiormente utilizzato per la valutazione dell'esposizione al benzene è l'acido *trans,trans*-muconico (t,t-MA), che comunque risente dell'effetto da coesposizione al toluene e dell'interferenza dell'acido sorbico, conservante e fungistatico alimentare, il cui prodotto metabolico però contribuisce alla concentrazione del t,t-MA urinario.

Tuttavia, a completamento dello studio di cui è oggetto questo lavoro, è stato messo a punto anche un metodo di analisi strumentale per la determinazione del t,t-MA mediante LC-ES-MS/MS, poiché tale tecnica comporta una specificità superiore raggiunta attraverso la frammentazione degli ioni (massa/massa).

Di seguito sono riepilogati i parametri relativi allo spettrometro di massa e al cromatografo liquido per la rivelazione del suddetto metabolita:

**Tabella riassuntiva dei parametri relativi allo spettrometro di massa e al cromatografo liquido per la rivelazione dell'acido t,t-MA**

---

<b>HPLC</b>	Fase mobile	metanolo/acqua
	Gradiente	(10-100)% metanolo in 10 min, 5 min isocratica al 100% MeOH
	Colonna	C18, 25 cm, 2,1 mm DI, 5 µm, 60Å
<b>Spettrometro di massa</b>	<i>Polarity</i>	negativa
	<i>Dry gas</i>	12 l/min
	<i>Nebulizer</i>	50 psi
	<i>Dry temperature</i>	300 °C
	<i>Trap drive</i>	20
	<i>Cap exit</i>	-50 V
	<i>Cap exit offset</i>	-35 V
	<i>Skimmer 1</i>	-15 V
	<i>Skimmer 2</i>	-5 V
	<i>Octopole</i>	-2 V
	<i>Octopole D</i>	-2 V
	<i>Octopole RF</i>	120 Vpp
	<i>Lens 1</i>	5 V
	<i>Lens 2</i>	60 V
	<i>End plate offset</i>	- 500 V
	<i>Capillary</i>	+ 4000 V
	<i>Isolation</i>	141 m/z
<i>Width</i>	5 m/z	
<i>Fragmentation cut-off</i>	40 m/z	
<i>Amplitude</i>	0,59 V	

---

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:  
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le Attività Editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, marzo 2002 (n. 1) 12° Suppl.*

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici  
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*