

Influenza del pH dopo idrolisi alcalina nella determinazione colorimetrica dei tioeteri urinari

E. RIZZI, L. POZZOBON, F. GIOFFRÉ, A. BUNGARO, A. TREVISAN^a

RIASSUNTO: L'influenza del pH nella reazione colorimetrica di Ellman per i gruppi tiolici è stata valutata al fine di migliorare la sensibilità della metodica di determinazione dei tioeteri urinari. Nel presente studio si dimostra come la reazione cromogena è più efficiente qualora avvenga in ambiente nettamente alcalino (tamponato), con un notevole aumento della sensibilità. Confrontate col metodo tradizionale che prevede la neutralizzazione prima della reazione di Ellman, le modifiche apportate dimostrano una ottima correlazione ($r = 0.941$), ma con valori di assorbanza mediamente tre volte più elevati. Altre variabili metodologiche sono discusse nel testo. (E. RIZZI, L. POZZOBON, F. GIOFFRÉ, A. BUNGARO, A. TREVISAN. Influenza del pH dopo idrolisi alcalina nella determinazione colorimetrica dei tioeteri urinari. *Progr Med Lab* 1987;2:123-126).

PAROLE CHIAVE: pH · Idrolisi alcalina · Tioeteri urinari

ABSTRACT: pH influence in the Ellman colorimetric reaction for the thiol groups was valued to improve the sensitivity of the method for the determination of the urinary thioethers. An high buffered alkalization after the alkaline hydrolysis is excellent to obtain high values of urinary concentration, with an increase of the sensitivity. The new method was compared with the usual colorimetric assay with an high correlation ($r = 0.941$) but with values three times higher of absorbance. Other methodological variables are discussed in the text. (E. Rizzi, L. Pozzobon, F. Gioffré, A. Bungaro, A. Trevisan. pH influence after alkaline hydrolysis during the colorimetric assay of the urinary thioethers. *Progr Med Lab* 1987;2:123-126).

KEY WORDS: pH · Alkaline hydrolysis · Urinary thioethers

Introduzione

La determinazione dei tioeteri urinari può essere eseguita seguendo una delle tre metodiche spettrofotometriche attualmente in uso^{1,3}. Tutte e tre sfruttano la reazione di Ellman⁴ dei gruppi tiolici liberi dopo idrolisi alcalina. Altri metodi sono meno usati o perché più indaginosi^{5,6} o perché superati⁷.

Il metodo di Vainio et al.³, il più largamente usato dalla letteratura scandinava^{8,9}, ha subito una severa critica¹⁰ poiché, teoricamente, l'idrolisi degli acidi mercapturici, anziché avvenire in ambiente alcalino, avviene in ambiente acido e in pratica le letture dei campioni risultano inferiori o uguali a quelle del bianco.

Il metodo più usato attualmente è quello di Doorn

et al.¹, il quale riduce al minimo l'interferenza dovuta alle elevate concentrazioni di cisteina disolfito nelle urine mediante due successive estrazioni con acetato di etile. Tale metodo è selettivo per gli acidi mercapturici ed altri tioeteri estraibili con solvente, ma è causa di falsi negativi nel caso di presenza di elevate concentrazioni di coniugati cisteinici a causa dell'incompleta estrazione di tali metaboliti. La doppia estrazione e la necessità di portare a secco il campione rendono tale metodo meno facilmente applicabile ad un largo numero di campioni.

Al metodo colorimetrico tradizionale, ritenendolo il più idoneo alla applicazione sul campo per il monitoraggio biologico delle sostanze alchilanti, abbiamo apportato alcune modifiche valutando l'influenza del pH nella reazione di Ellman⁴.

Materiali e Metodi

Tutti i procedimenti analitici sono stati effettuati su campioni estemporanei di urine umane subito dopo il prelievo. Di seguito vengono riportate le procedure seguite.

^a Istituto di Medicina del Lavoro, Università degli Studi, Padova

Corrispondenza a: Dr. A. Trevisan, Istituto di Medicina del Lavoro, Università degli Studi, via Facciolati 71, 35127 Padova

Lavoro giunto in Redazione il 15-01-1987

Valutazione del tempo di idrolisi alcalina: nella metodica tradizionale¹⁰ viene indicato come necessario un tempo di idrolisi alcalina con NaOH 2.5 N di 50 min in bagno bollente (100 °C). Per valutare l'effettiva necessità di tale tempo, sono state eseguite prove di idrolisi alcalina ai minuti 10, 20, 30, 40 e 50, proseguendo poi l'analisi con la metodica da noi proposta.

Influenza del pH nella reazione di Ellman: per valutare l'optimum di pH nella reazione di Ellman sono stati eseguiti due diversi esperimenti. Nel primo esperimento l'HCl è stato aggiunto alle seguenti normalità: 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 e 2.5 (con quest'ultima si ottiene la neutralizzazione dopo l'idrolisi alcalina). Nel secondo l'idrolisi alcalina è stata eseguita variando la normalità dell'NaOH (1.0; 1.5; 2.0 e 2.5) e, dopo l'idrolisi, è stata aggiunta acqua invece di HCl per mantenere inalterati i volumi finali. I volumi sono quelli della metodica descritta. Per ognuna di tali prove è stato determinato il pH dopo l'aggiunta del tampone Na⁺/K⁺ fosfato e prima dell'aggiunta del cromoforo. Tutte le soluzioni impiegate sono state titolate di volta in volta prima dell'uso contro soluzioni standard di NaOH e HCl.

Procedura analitica: è stata modificata come indicato in Tabella I. Con la nuova procedura analitica sono state definite le possibilità di conservazione del campione (temperatura ambiente, 4 °C, -20 °C), con e senza l'aggiunta di un antiossidante come l'acido L-ascorbico a dosi definite (5 mg/10 ml di urina). È stata inoltre confrontata tale procedura analitica col metodo di Sperduto et al.¹⁰ su 23 campioni ed è stata valutata l'influenza del fumo sulla escrezione urinaria dei tioeteri. I risultati sono espressi in questo caso in µmol/mmol di creatinina.

Tab. I - Procedura analitica della nuova metodica adottata.

A.	urina	ml	2.0
	TCA 12.5 %	ml	0.5
	centrifugare 15 min a 3000 rpm		
B.		Bianco	Campione
	Supernatante	ml	0.5
	H ₂ O	ml	0.75
	NaOH 2.5 N	ml	0.0
	15 min in bagno bollente *		
	10 min di raffreddamento in ghiaccio		
C.	HCl 1.0 N	ml	0.0
	H ₂ O	ml	0.5
			0.5 *
D.	Prelevare	ml	0.5
	Tampone	ml	4.0
	DTNB	ml	0.6
	leggere dopo 5 min esatti a 412 nm		

Linearità: 0.2-5.0 mmol/L; * modifiche apportate.
TCA: acido tricloroacetico; Tampone: tampone Na⁺/K⁺ fosfato 0.35 mol/L, pH 7.8; DTNB: acido ditionitrobenzoico 10 mmol/L in tampone Na⁺/K⁺ fosfato 0.35 mol/L, pH 7.8.

Le determinazioni colorimetriche sono state effettuate con uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 550 (Norwalk, Connecticut, USA).

Risultati

Come dimostrato in Tabella II non vi sono differenze significative tra un tempo di idrolisi alcalina compresa tra 10 e 50 min, per cui nel metodo messo a punto tale tempo è stato standardizzato a 15 min, anche al fine di abbreviare i tempi di analisi.

Tab. II - Valutazione del tempo necessario alla idrolisi alcalina in bagno bollente (100 °C).

Tempo (min)	Assorbanza
10	0.520
20	0.546
30	0.533
40	0.568
50	0.561

I valori di concentrazione urinaria dei tioeteri (Fig. 1) aumentano con l'aumentare della alcalinità residua dopo idrolisi alcalina. In presenza di NaOH ad elevata normalità (2.5 N), la presenza dell'HCl, anche a bassa normalità, è necessaria per evitare una eccessiva ed instabile assorbanza dopo l'aggiunta del cromoforo.

Nel mettere a punto la metodica si è ritenuto di

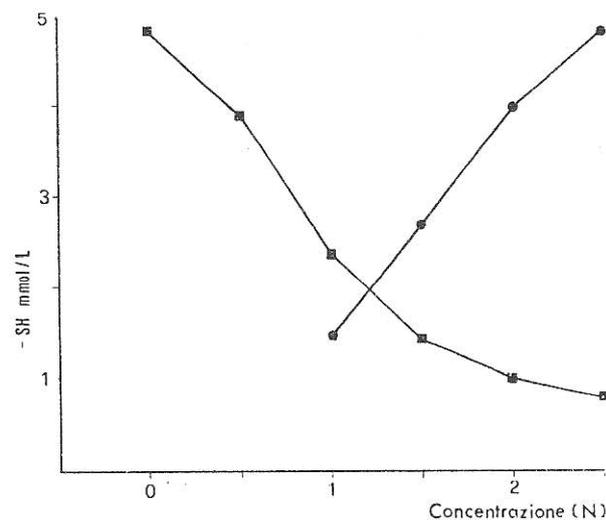


Fig. 1 - Concentrazione urinaria degli acidi mercapturici alle diverse normalità di HCl (■) dopo idrolisi alcalina (NaOH 2.5 N) e di NaOH (●) per l'idrolisi alcalina. Nel secondo caso, dopo l'idrolisi, è stata aggiunta acqua al posto di HCl.

utilizzare una concentrazione di HCl 1.0 N al fine di ottenere una alcalinizzazione residua con un pH compreso tra 12 e 13; in tale modo appare notevolmente aumentata la sensibilità del metodo. Sono state quindi eseguite delle prove comparative col metodo di Sperduto et al.¹⁰; come evidenziato in Figura 2 la correlazione appare ottimale ($r = 0.941$).

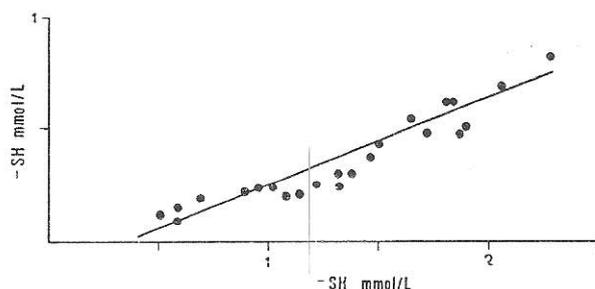


Fig. 2 - Correlazione tra campioni urinari determinati con la metodica da noi messa a punto (ascisse) ed il metodo tradizionale (ordinate). (L'equazione della retta è: $y = 0.385x - 0.14$, $r = 0.941$).

Una corretta conservazione del campione è essenziale per l'attendibilità dei risultati; la conservazione migliore è stata possibile in presenza di acido L-ascorbico, a -20°C e per un periodo limitato a due settimane (per tale periodo i campioni si mantengono stabili); a 4°C (nelle stesse condizioni) la stabilità è limitata a 24 ore.

In Tabella III sono presentati i valori normali rilevati in soggetti di sesso maschile fumatori e non fumatori. A conferma della letteratura³, nei fumatori l'escrezione urinaria dei tioeteri appare significativamente più elevata ($p < 0.05$). Per confronto, nella stessa Tabella III, sono indicati i valori normali riscontrati in ratti maschi, albini, Wistar; l'escrezione di tali metaboliti appare di circa tre volte più elevata rispetto all'uomo.

Il coefficiente di variazione (CV) della metodica adottata è, nel nostro laboratorio, di $\pm 3\%$. Lo sviluppo del colore è tempo dipendente dopo l'aggiunta del cromoforo, per cui si è ritenuto utile standardizzare tale tempo a 5 min.

Tab. III - Valori normali dei tioeteri urinari riscontrati in soggetti fumatori e non fumatori di sesso maschile e in ratti.

	N.	-SH $\mu\text{mol}/\text{mmol}$	
		creatinina	p
Non fumatori	10	82.4 ± 14.3	
Fumatori	15	99.0 ± 20.8	< 0.05
Ratti	50	250.9 ± 61.0	

Discussione

La determinazione dei tioeteri urinari è stata indicata quale esame da eseguire nel monitoraggio biologico delle sostanze alchilanti. A tale finalità è stata utilizzata, per valutare l'esposizione dei lavoratori della gomma^{3,8,9}, l'esposizione a cloruro di metile¹¹, a tetracloroetilene¹², a rifiuti chimici dei forni inceneritori¹³.

Le ampie possibilità di impiego debbono quindi avvalersi di metodiche semplici dal punto di vista analitico e non indagative, applicabili quindi contemporaneamente ad un elevato numero di campioni. Sembrano pertanto scarsamente utilizzabili sia la metodica di Buffoni et al.⁵, sia, in parte, la metodica proposta da Doorn et al.¹. In particolare quest'ultima, escludendo tutti o quasi i cistein-coniugati, risulta inapplicabile nel monitoraggio di sostanze che vengano principalmente escrete sotto tale forma.

Riteniamo quindi che la metodica colorimetrica di Ellman dopo idrolisi alcalina sia la più semplice e quindi la preferibile.

La metodica da noi messa a punto, pur mantenendosi sul piano dei precedenti metodi colorimetrici^{2,3,10}, utilizza una elevata alcalinizzazione, invece della neutralizzazione, dopo l'idrolisi alcalina. L'alcalinità elevata consuma tutto il difosfato presente che si trasforma nella sua base coniugata eliminando l'azione tamponante a pH 7.8 e residuando un pH finale fortemente alcalino. In tali condizioni le specie in equilibrio del fosfato realizzano una azione tampone sfruttando la terza dissociazione dell'acido fosforico che ha un pK_{a3} di 12.4, mantenendo il pH costante attorno a tale valore con variazioni comprese tra ± 2 unità di pH.

Due considerazioni sono quindi possibili: a) non usando l'acido cloridrico e usando NaOH 2.5 N, la concentrazione residua di soda rende inefficiente il tampone a pH 12.4 consumando tutto il fosfato dissociato disponibile all'equilibrio durante lo sviluppo del colore; b) le specie ioniche che si liberano dalla reazione cromogena modificano continuamente il pH rendendo instabile la lettura spettrofotometrica. La piccola differenza di assorbanza tra campioni con alcalinità residua eguale, ma differenti per l'aggiunta dopo l'idrolisi alcalina di acido cloridrico o di acqua, è verosimilmente imputabile al cosiddetto "effetto sale". Tale effetto si traduce in una lieve riduzione del pH dovuta alla maggior ionizzazione degli elettroliti deboli per l'aumentata attrazione interionica dovuta agli ioni derivanti dalla completa dissociazione del sale (NaCl). L'effetto è verosimilmente ancora maggiore in condizioni di neutralizzazione a causa della maggior concentrazione del sale presente che costituisce l'unico elettrolita forte.

L'alcalinità del mezzo mantiene elevata la dissociazione dei radicali sulfidrilici disponibili alla reazione col cromoforo con conseguente aumento della colorazione.

Conclusioni

La correlazione ottimale tra la metodica da noi messa a punto e quella che prevede la neutralizzazione dopo idrolisi alcalina¹⁰ dimostra chiaramente che le modifiche apportate non causano variazioni incontrollate dell'assorbanza ma, anzi, aumentano la sensibilità del metodo consentendo di determinare anche concentrazioni di tioeteri molto basse. La riduzione del tempo di idrolisi alcalina a 15 min anziché prostrarla per 50 min permette inoltre una maggior rapidità della metodica. La stabilizzazione del pH su elevati valori di alcalinità permette infine una minor facilità di errore dovuta ai comuni mezzi di misura (bilancia, pipette).

Bibliografia

1. van Doorn R, Bos RP, Leijdekkers Ch-M, et al. Thioether concentration and mutagenicity of urine from cigarette smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 1979;43:159-66.
2. Seutter-Berlage F, van Dorp LH, Kosse HGJ, Henderson PTh. Urinary mercapturic acid excretion as a biological parameter of exposure to alkylating agents. *Int Arch Occup Environ Health* 1977;39:45-51.
3. Vainio H, Savolainen H, Kilpikari I. Urinary thioether of employees of a chemical plant. *Br J Ind Med* 1978;35:232-4.
4. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
5. Buffoni F, Coppi C, Santoni G. Determination of thioethers in urine. *Clin Chem* 1982;28:248-50.
6. Vermeulen NPE, Onkenhout W, van Bladeren PJ. The analysis of mercapturic acids in biological fluids; application of gas-liquid chromatography and (ei- and ci-) mass spectrometry. In: Frigerio A, ed. *Chromatography and mass spectrometry in biomedical sciences*. Amsterdam-London-New York: Elsevier, 1983:39-52.
7. James SP, Waring RH, White DA. Separation of mercapturic acids and related compounds gas chromatography and a method for the determination of hippuric acid. *J Chromatogr* 1967;26:255-8.
8. Kilpikari I. Correlation of urinary thioethers with chemical exposure in a rubber plant. *Br J Ind Med* 1981;38:98-100.
9. Kilpikari I, Savolainen H. Increased urinary excretion of thioethers in new rubber workers. *Br J Ind Med* 1982;39:401-3.
10. Sperduto G, Gianello G, La Bua R, et al. Thioeteri urinari in lavoratori di una fabbrica di pneumatici. Prime risultanze analitiche. *Atti 46° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Acireale (CT)-Noto (SR) 29 Settembre-1 Ottobre 1983:589-602.*
11. van Doorn R, Borm PJA, Leijdekkers Ch-M, Henderson PTh, Reuvers J, van Bergen TJ. Detection and identification of S-methylcysteine in urine of workers exposed to methyl chloride. *Int Arch Occup Environ Health* 1980;46:99-109.
12. Lafuente A, Mallol J. Thioethers in urine during occupational exposure to tetrachloroethylene. *Br J Ind Med* 1986;43:68-9.
13. van Doorn R, Leijdekkers Ch-M, Bos RP, Brouns RME, Henderson PTh. Enhanced excretion of thioethers in urine of operators of chemical waste incinerators. *Br J Ind Med* 1981;38:187-90.