

Determinación de 1-hidroxipireno en orina - Método de hidrólisis enzimática con detección fluorimétrica / Cromatografía líquida de alta resolución

MTA/MB-023/A99

Palabras clave: 1-hidroxipireno, metabolitos HAPs, cromatografía líquida.

PRESENTACIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen un grupo de compuestos que han recibido una especial atención a causa de que muchos de ellos son carcinogénicos o mutagénicos. Dentro del campo laboral, la exposición potencial a estos compuestos puede tener lugar en diferentes tipos de industrias como fundiciones de hierro y acero, la industria del aluminio, la industria de la goma y el caucho, plantas de coque, refinerías de petróleo, en la fabricación y uso de alquitrán, asfaltos y derivados, en trabajos de limpieza de chimeneas, etc.

La evaluación de la exposición potencial a HAP puede llevarse a cabo mediante el análisis de los hidrocarburos en el aire ambiente de trabajo, pero, complementariamente, el análisis en orina de sus metabolitos hidroxilados y en particular del 1-Hidroxipireno constituye una herramienta de gran utilidad para el estudio de la exposición genérica a HAP.

El método "*Determinación de 1-Hidroxipireno en orina. Método de hidrólisis enzimática y detección fluorimétrica / Cromatografía líquida de alta resolución*" es un **MÉTODO ACEPTADO** por el [Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo \(INSHT\)](#). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende un método utilizado en el INSHT y que ha sido sometido a un protocolo de validación por organizaciones oficiales competentes en el área de la normalización de métodos analíticos, o bien ha sido adoptado como método recomendado por asociaciones profesionales dedicadas al estudio y evaluación de riesgos por agentes químicos, así como aquellos métodos recomendados por la UE o basados en métodos ampliamente conocidos y evaluados por especialistas en este tipo de análisis.

Índice

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1. Acetonitrilo grado gradiente

3.2. Acetato sódico

3.3. Ácido acético, glacial

3.4. Agua ultrapura

3.5. Enzima obtenido de *Helix pomatia* con actividad Beta-Glucuronidasa/Arilsulfatasa

3.6. Helio

3.7. 1-Hidroxipireno

3.8. Tamiz molecular

3.9. Disolución tampón 0,2 M ácido acético/acetato

3.10. Disolución de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (30 mmol l⁻¹)

3.11. Disolución de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (24 mmol l⁻¹)

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Balanza

4.2. Baño de ultrasonidos

4.3. Baño con agitación orbital y control de temperatura

4.4. Bomba de vacío

4.5. Filtros Millipore

4.6. Filtros Millex-HV

4.7. Frascos de polietileno

4.8. Jeringas desechables

4.9. Material de vidrio

4.10. Micropipetas automáticas

4.11. Pipetas Pasteur

4.12. Rotavapor

4.13. Tapones

4.14. Viales

4.15. Equipo de filtración

4.16. Columnas para extracción en fase sólida

4.17. Columna cromatográfica

4.18. Equipo de cromatografía de alta resolución

4.19. Precolumnas

5. TOMA DE MUESTRA

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza del material

6.2. Preparación de la muestra

6.3. Preparación de patrones y curva de calibrado

6.4. Determinación

7. CÁLCULOS

8. PRECISIÓN

9. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de 1-hidroxipireno (1-HP) (Nº CAS 5315-79-7) en orina mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica (HPLC-F) en el intervalo de concentración 0,06 - 6,0 nmol 1-HP por litro de orina.

El método es aplicable en poblaciones laborales potencialmente expuestas a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) para la evaluación de la exposición global a los mismos.

Se considera como interferencia cualquier otro compuesto orgánico que presente el mismo o próximo tiempo de retención que los compuestos a analizar en las condiciones de operación descritas en este método. Estas interferencias pueden minimizarse seleccionando las condiciones y columnas cromatográficas adecuadas.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de orina se congelan a -25 °C. Una alícuota de 10 ml se hidroliza enzimáticamente 18 horas a 37 °C y pH = 5, ajustado con tampón acético acetato 0,2 M. Tras un proceso de limpieza mediante extracción sólido-líquido y de evaporación del disolvente, el residuo se reconstituye en acetonitrilo. El 1-hidroxipireno se determina mediante cromatografía líquida de fase reversa con detección fluorimétrica utilizando un programa de gradiente de concentración adecuado.

3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1. Acetonitrilo grado gradiente

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA E INFLAMABLE. Frases (R): 11, 23-25. Frases (S): 2, 7, 16, 24. [Real Decreto 363/1995 \(9.8.\)](#).

3.2. Acetato sódico

3.3. Ácido acético, glaciar, para cromatografía líquida.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 10-35. Frases (S): 2, 23-26. [Real Decreto 363/1995 \(9.8.\)](#).

3.4. Agua ultrapura, calidad 1 de acuerdo con la NORMA ISO 3696 (9.9.).

3.5. Enzima obtenido de Helix pomatia con actividad β -Glucuronidasa/Arilsulfatasa (100.000 Fishman U ml⁻¹, 800.000 Roy U ml⁻¹), en solución acuosa estabilizada con timerosal.

3.6. Helio, calidad N-50.

PRECAUCIÓN: ASFIXIANTE. Frases (S): 3-7. [Real Decreto 363/1995 \(9.8.\)](#).

3.7. 1-Hidroxipireno

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA IRRITANTE. Frases (R): 36-37-38. Frases (S): 26-37/39. [Real Decreto 363/1995 \(9.8.\)](#).

3.8. Tamiz molecular, 0,3 nm de tamaño de poro.

3.9. Disolución tampón 0,2 M ácido acético/acetato, pH = 5.0. Se disuelven 12,46 g de acetato sódico en agua (3.4.) y se añaden 2,88 g de ácido acético glaciar, enrasándose a 1 litro con agua.

3.10. Disolución de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (30 mmol l⁻¹). Se pesan 0,010 g de 1-hidroxipireno y se disuelven en 1,5 ml de acetonitrilo.

3.11. Disolución de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (24 mmol l⁻¹). Se toman 20 μ l de la disolución descrita en el apartado 3.10. y se diluye hasta 25 ml de acetonitrilo. La disolución se prepara por pesada.

3.12. Disolución de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (240 nmol l⁻¹). Se pesan 10 μ l de la disolución descrita en el apartado 3.11. y se diluye a 1 ml con acetonitrilo. La disolución se prepara por pesada.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Balanza capaz de pesar 0,01 mg.

4.2. Baño de ultrasonidos

4.3. Baño con agitación orbital y control de temperatura, SBS 30, Stuart Scientific (o similar).

4.4. Bomba de vacío, para la filtración del agua desionizada.

4.5. Filtros Millipore tipo HAWP, HA de 0,45 µm, 47 mm (o similar) para filtración de agua.

4.6. Filtros Millex-HV, de tamaño de poro 0,45 µm, Millipore (o similar) para filtración de acetonitrilo.

4.7. Frascos de polietileno para el muestreo de orina.

4.8. Jeringas desechables de 10 y 1 ml.

4.9. Material de vidrio de borosilicato de acuerdo con la norma ISO 3585.

4.10. Micropipetas automáticas de 1-100 µl y de 100-1000 µl.

4.11. Pipetas Pasteur

4.12. Rotavapor

4.13. Tapones con septum para los viales.

4.14. Viales de 1,5 ml de capacidad.

4.15. Equipo de filtración, para agua y disolventes cromatográficos.

4.16. Columnas para extracción en fase sólida, RP-18 (500 mg), Merck (o similar).

4.17. Columna cromatográfica: Cartucho Lichrosorb^R RP-18, 250 x 4 mm ID, 5 µm de tamaño de partícula, Merck (o similar).

4.18. Equipo de cromatografía de alta resolución con detector fluorimétrico (HPLC-F).

4.19. Precolumnas Lichrocart^R 4-4, Lichrospher^R 100 RP-18, 5 µm de tamaño de partícula, Merck.



5. TOMA DE MUESTRA

5.1. Las muestras de orina se recogen en frascos de polietileno. A continuación se filtran a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro, manteniéndose a -25 °C hasta su análisis.



6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza del material

6.1.1. El material de vidrio utilizado en el análisis, después de lavado con mezcla crómica, es aclarado con agua (3.4.).

6.1.2. Se utilizan viales desechables o completamente limpios y secos. Para la introducción de las muestras en los viales se utilizan pipetas Pasteur desechables.

6.1.3. Los filtros utilizados en la filtración de las muestras, así como las jeringas también serán desechables.



6.2. Preparación de la muestra

6.2.1. Hidrólisis enzimática

6.2.1.1. Se toma un volumen de muestra de 10 ml de orina y se añaden 10 ml del tampón ácido acético/acetato (3.9.).

6.2.1.2. Se añaden 100 µl del enzima (3.5.).

6.2.1.3. Las muestras se introducen en el baño de agitación orbital a 70 r.p.m. y 37 °C durante 18 h.

6.2.2. Limpieza de las muestras

La limpieza de los extractos se efectúa mediante extracción sólido-líquido, empleando cartuchos de extracción RP-18 en un sistema de vacío múltiple con control de presión.

6.2.2.1. El cartucho se acondiciona con 5 ml de acetonitrilo y 10 ml de agua.

6.2.2.2. Se adiciona la muestra.

6.2.2.3. Se limpia el cartucho con 10 ml de agua: acetonitrilo (90:10).

6.2.2.4. Se eluye con 5 ml de acetonitrilo, despreciando las primeras gotas.

NOTA: En ningún momento se debe dejar secar el cartucho.

6.2.2.5. El extracto se seca con tamiz molecular.

6.2.2.6. El disolvente se elimina en el rotavapor a una temperatura del baño de 50 °C, llevándolo a sequedad.

6.2.2.7. El residuo se redissuelve con 1 ml de acetonitrilo.

6.2.2.8. La disolución obtenida se pasa a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (4.6.) y se introduce en viales.



6.3. Preparación de patrones y curva de calibrado

6.3.1. Disolución de trabajo. Se preparan las disoluciones tal como se indican en los apartados 3.10., 3.11. y 3.12.

6.3.2. Se añaden 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 100, 200 y 250 microl de la disolución 3.12. a 10 ml de orina y se procede según el apartado 6.2.2.

6.3.3. El análisis de las muestras, patrones y blanco se lleva a cabo inyectando en la columna 20 µl de cada uno de ellos, tras tres sucesivos lavados de bucle con el mismo volumen. Los patrones y las muestras se analizarán por triplicado. Para la cuantificación de las muestras se empleará el valor medio de las tres inyecciones.

6.3.4. Curva de calibración. La curva de calibración se traza representando las lecturas en altura absoluta del pico del compuesto frente a sus concentraciones (en nmol l⁻¹).



6.4. Determinación

Las condiciones cromatográficas empleadas en la determinación son las siguientes:

Columna: Cartucho Lichrosorb^R RP-18, 250 x 4 mm ID. (5 µm)
Caudal: 1,5 ml min⁻¹.
Temperatura: 30 °C.
Eluyente: acetonitrilo y agua.
Longitudes de onda: λ_{ex} (nm) = 242, λ_{em} (nm) = 388.
Volumen de inyección: 20 µl.
Programa de gradiente para la determinación de 1-hidroxipireno.

| Tiempo (min) | Acetonitrilo (%) |
|--------------|------------------|
| 7,5 | 60 |
| 10,0 | 95 |
| 12,5 | 95 |
| 14,0 | 60 |
| 15,5 | 60 |

7. CÁLCULOS

7.1. La concentración de 1-hidroxipireno expresada en nanomoles por litro de acetonitrilo (a) se determina por interpolación de la altura de pico absoluta del compuesto en la recta de calibrado.

7.2. Los resultados se puede expresar como concentración de 1-hidroxipireno en orina mediante la siguiente expresión:

$$b = (a \times 1) / v$$

donde:

b es la, concentración de 1-hidroxipireno en orina (nmol l⁻¹).

a es la concentración de 1-hidroxipireno en acetonitrilo (nmol l⁻¹).

1 es el volumen final de la disolución (ml de acetonitrilo).

v es el volumen de orina empleado (10 ml).

7.3. La concentración final se refiere a la cantidad de creatinina en orina mediante la expresión:

$$d = b/c$$

donde:

d es la concentración de 1-hidroxipireno respecto a la de creatinina en orina (μmol 1-HP mol creatinina⁻¹).

b es la concentración de 1-hidroxipireno en orina (nmol l⁻¹).

c es la concentración de creatinina en orina (mmol l⁻¹).

8. PRECISIÓN

8.1. La precisión, en términos de coeficiente de variación, en todo el intervalo de concentración ensayado, tanto en un día como entre días, resultó ser inferior al 4% (Véase [tabla 1 del Anexo A](#)).

8.2. El intervalo de trabajo se encuentra comprendido entre 0,06 y 6,0 nanomoles de 1-hidroxipireno por litro de orina.

8.3. El límite de detección para el 1-hidroxipireno en orina calculado a partir de la ecuación de la recta de calibrado, según el criterio de Miller y col ([9.12.](#)), es de 0,02 nmol por litro. Calculado a partir del valor medio de una serie de muestras en blanco más tres veces la desviación estándar del blanco ([9.13.](#)) se obtuvo un valor de 0,04 nmol por litro (Véase [tabla 2 del Anexo A](#)).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion, P.Th. Henderson. **Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine**. J. of Chromatography, 413: 227-232 (1987).
2. W.P. Tolos, P.B. Shaw, L.K. Lowry, B.A. MacKenzie, J.F. Deng, H.L. Markel. **1-Pyrenol: a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons**. Appl. Occup. Environ. Hyg. 5: 303-309 (1990).
3. F.J. Jongeneelen. **Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures**. The Science of the Total Environmental. 199: 141-149 (1997).
4. F.J. Jongeneelen. **Biological exposure limit for occupational exposure to coal tar pitch volatiles at cokeovens**. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 63: 511-516 (1992).
5. D. Sherson, P. Sabro, T. Sigsgaard, F. Johansen, H. Autrup. **Biological monitoring of foundry workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons**. British Journal of Industrial Medicine, 47, 448-453 (1990).
6. J.G.M. VanRooij, M.M. Bodelier-Bade, P.M.J. Hopmaans, F. J. Jogeneelen. **Reduction of urinary 1-hydroxypyrene excretion in coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons due to improved hygienic skin protective measures**. Ann. Occup. Hyd., 38, 247-256 (1994).

7. R. Quilan, G. Kowalczyk, K. Gardiner, LA. Calvert, K. Hale, S.T Walton, **Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coal liquefaction workers: the value of urinary 1-hydroxypyrene excretion in the development of occupational hygiene control strategies**. Ann. Occup. Hyd., 39, 329-346 (1995).
8. **Real Decreto 363/1995** ⁽¹⁾ de 10 de marzo (BOE de 5.6.95). **"Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado, y etiquetado de sustancias peligrosas"**. Modificado por Orden de 13 de Septiembre de 1995 (BOE de 19.9.95).
9. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio**. Especificaciones.
10. ISO 8655, "Partes 1 a 4". **Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo**.
11. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes. Propiedades del vidrio borosilicatado**.
12. J.C. Miller, J.N. Miller, **Estadística para Química Analítica**, Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington, 1993, pp 100-103.
13. Royal Society of Chemistry. **Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit**. Analyst, vol. 112, 1987.

ANEXO A

TABLA 1
Cálculo de la precisión

| | Concentración nmol l ⁻¹ orina | n° réplicas | CV % |
|-----------|---|-------------|---------|
| Intradía | 0,81 | 11 | 4,0 |
| | 1,71 | 11 | 1,1 |
| Entredías | 0,47 | 7 | 3,9 |
| | 1,34 | 7 | 3,1 |

TABLA 2
Cálculo del límite de detección

1. El límite de detección calculado a partir de la ecuación de la recta de calibrado según el criterio de Miller y col ($0.0 + 3.sx/y$) es de 0,02 nmol l⁻¹ orina.
2. El límite de detección calculado a partir del valor medio del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco, medidas recogidas en la [tabla 2](#), es de 0,04 nmol l⁻¹ orina.

Señales analíticas proporcionadas por blancos de orina

| Réplica | Altura fluorescente (%) |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 0,0240 |
| 2 | 0,0501 |
| 3 | 0,0127 |
| 4 | 0,0204 |
| 5 | 0,0134 |
| 6 | 0,0413 |
| 7 | 0,0173 |
| 8 | 0,0133 |
| 9 | 0,0274 |
| 10 | 0,0223 |
| 11 | 0,0376 |
| media, y_B | 0,0257 |
| desviación estándar, S_B | 0,0123 |

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



ADENDA

Revisión normativa

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

