



## Exposición a HAPs y Control biológico: determinación simultánea de HAPs hidroxilados en orina

Poster: XXIX Reunión Científica del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines. Alcalá de Henares, 12-14 de julio de 2000.

Urbieto, M.T., Eguiarte, I. y Montes, J.  
Centro Nacional de Verificación de Maquinaria. INSHT  
E-mail: areacont@mtas.es

### Introducción

Un gran número de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) se consideran cancerígenos o mutágenos para el hombre <sup>(1)</sup>. La exposición a HAPs en el campo laboral hace necesario el control de dicha exposición siendo la medida de HAPs en aire el método mas utilizado.

La penetración dérmica es una importante vía de entrada <sup>(2)</sup>, por lo que se hace necesario el control biológico de la exposición.

Siendo el pireno un hidrocarburo común en la mayor parte de las mezclas de HAPs, su metabolito, 1-hidroxipireno, se ha usado como indicador biológico de los HAPs <sup>(3-5)</sup>.

Ya que los efectos cancerígenos de los diferentes HAPs son distintos, el control de varios metabolitos de HAPs puede mejorar la evaluación de la exposición a HAPs <sup>(6-10)</sup>.

En este trabajo se presentan dos métodos complementarios para la determinación simultánea de derivados monohidroxilados de fenantreno y pireno: 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hidroxifenantreno (HOFEN) y 1-hidroxipireno (HOPIR) en orina.

### Determinación simultánea de Hidroxipireno e Hidroxifenantrenos en orina

### Experimental

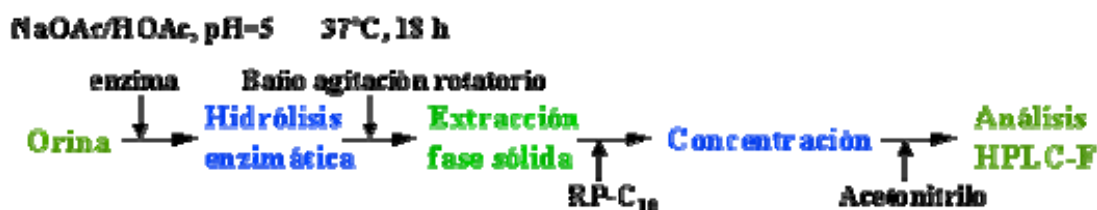
#### Reactivos

- 1-Hidroxipireno 98% (Aldrich);  
1-Hidroxifenantreno 99%;  
2-Hidroxifenantreno 99%;  
3-Hidroxifenantreno 99%;  
4-Hidroxifenantreno 99% (Promochem); 9-Hidroxifenantreno 82.5% (Aldrich).
- Enzima obtenido de *Helix pomatia* con actividad  $\beta$ -Glucuronidasa/Arilsulfatasa (100 000 Fishman U ml<sup>-1</sup>, 800 000 Roy U ml<sup>-1</sup>) (Boehringer Mannheim).

#### Equipo

- Sistema HPLC Modelo HP 1050 con detector de fluorescencia HP 1046A
- Columna: LiChroCART LiChrospher → PAH, 250 x 4 mm ID, 5  $\mu$ m, Merck

## Procedimiento



## Métodos cromatográficos

- Volúmen de inyección 20  $\mu$ l,
- temperatura: 40 °C,
- $\lambda_{ex}$  (nm) = 242,
- $\lambda_{em}$  (nm) = 388,

Tabla 1: Condiciones cromatográficas de los métodos A y B

MÉTODO A		MÉTODO B	
<b>Caudal:</b> 1.4 ml/min,		<b>Caudal:</b> 1.0 ml/min	
<b>Fase móvil:</b> Acetonitrilo:Agua		<b>Fase móvil:</b> Metanol:Agua	
<b>Programa de gradiente:</b>		<b>Programa de gradiente:</b>	
Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)	Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)
12	30	10	50
25	69	25	70
		30	80

## Resultados y discusión

Optimizado el proceso de limpieza mediante extracción en fase sólida, desechándose los primeros 200  $\mu$ l de eluyente (Tabla 2, Fig. 1) se analizaron muestras de orina de cinco no fumadores y cinco fumadores no expuestos laboralmente a HAPs. Los resultados se corrigieron con el contenido en creatinina desestimándose dos valores de las muestras de orina de no fumadores debido a los bajos valores de creatinina, próximos a 2  $\text{mmol l}^{-1}$ .

Se presentan los cromatogramas (Fig. 2) y valores de hidroxifenantrenos e hidroxipireno (Fig. 3, Fig. 4) contenidos en las orinas de un fumador y un no fumador representativos de los resultados obtenidos, según el método A (coeluyen 2- y 3-hidroxifenantreno) y el método B (coeluyen 2- y 9-hidroxifenantreno).

Se calculan los límites de detección (Fig. 5) a partir de las rectas de calibrado<sup>(11)</sup>. No se presentan los límites de detección del 2-HOFEN y 3-HOFEN con el método A debido a que ambos coeluyen, así como el 2-HOFEN y 9-HOFEN con el método B por el mismo motivo.

## Optimización en la extracción en fase sólida

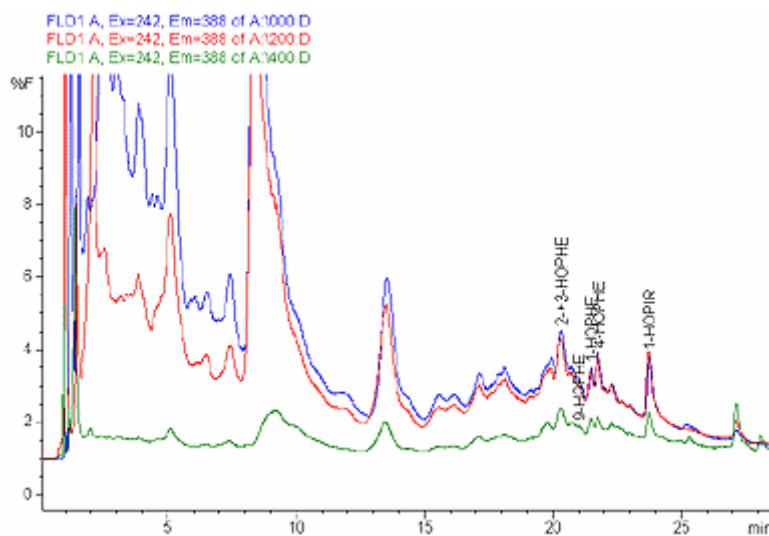


Figura 1

Tabla 2	0 $\mu\text{l}$ $\text{CH}_3\text{CN}$	200 $\mu\text{l}$ $\text{CH}_3\text{CN}$	400 $\mu\text{l}$ $\text{CH}_3\text{CN}$
1-HOFEN ( $\text{nmol l}^{-1}$ )	57.37	57.61	35.18
4-HOFEN ( $\text{nmol l}^{-1}$ )	47.63	46.26	18.57
9-HOFEN ( $\text{nmol l}^{-1}$ )	36.17	37.02	16.70
1-HOPIR ( $\text{nmol l}^{-1}$ )	43.63	43.07	18.51

Optimización del proceso de limpieza de una orina de fumador, por desecho de las primeras fracciones del eluyente en el sistema de extracción en fase sólida.

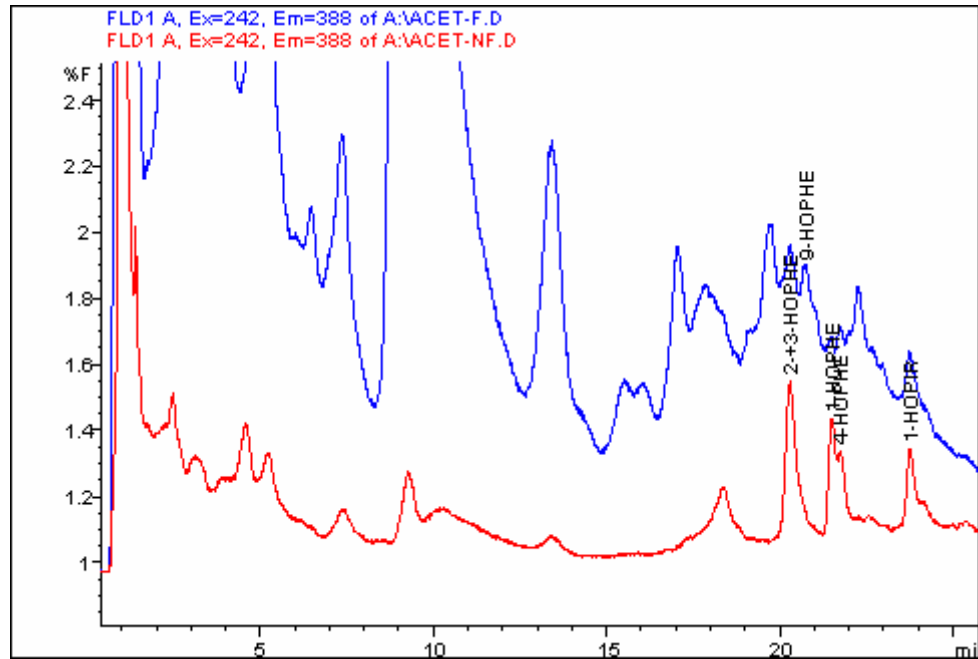
Azul: sin desechar;

rojo: desechados los primeros 200  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo,

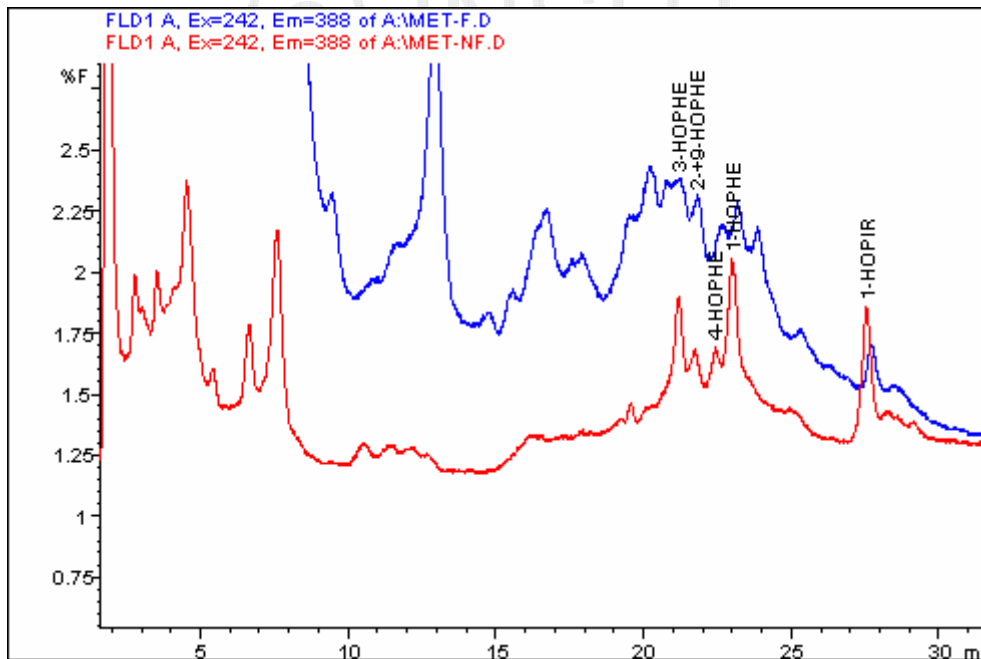
verde: desechados los primeros 400  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo.

A partir de 200  $\mu\text{l}$  se pierden los analitos de interés.

## Metabolitos de HAPs: Hidroxifenantrenos e Hidroxipireno en orina de personas laboralmente no expuestas



Método A



Método B

Fig. 2: Cromatogramas por el Método A y Método B de un no fumador y un fumador no expuestos

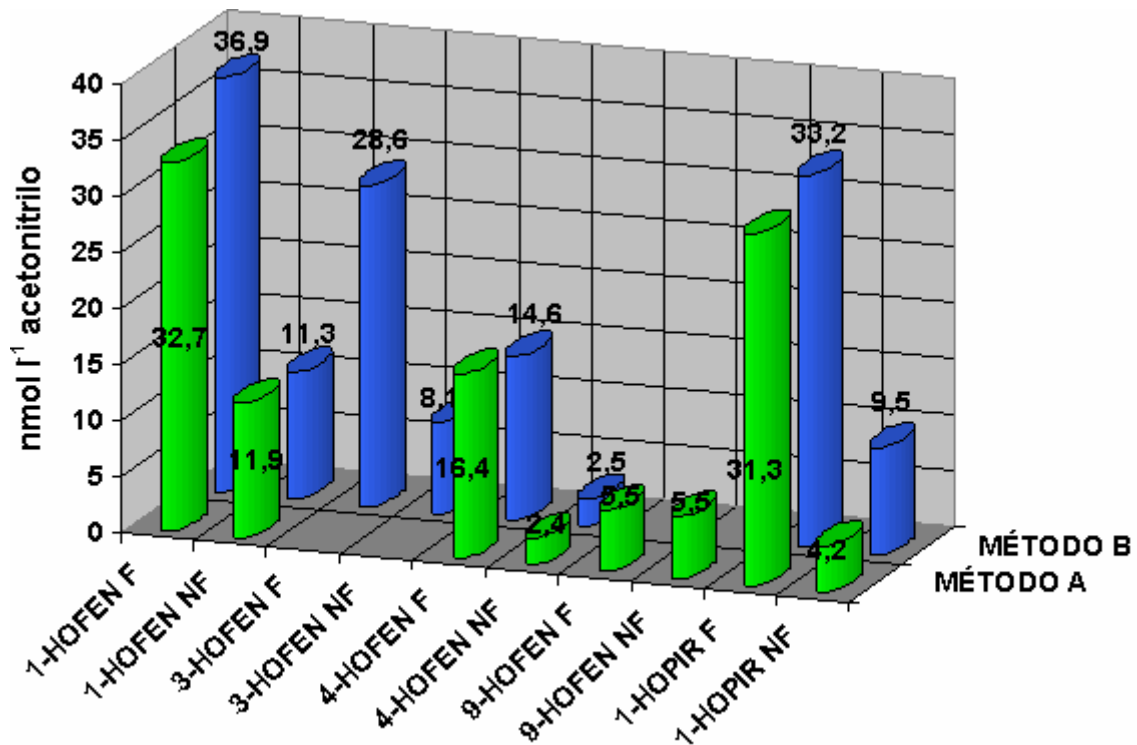


Fig. 3: Resultados de hidroxifenantrenos e hidroxipireno en nmol/l acetonitrilo para un fumador y un no fumador por los métodos A y B.

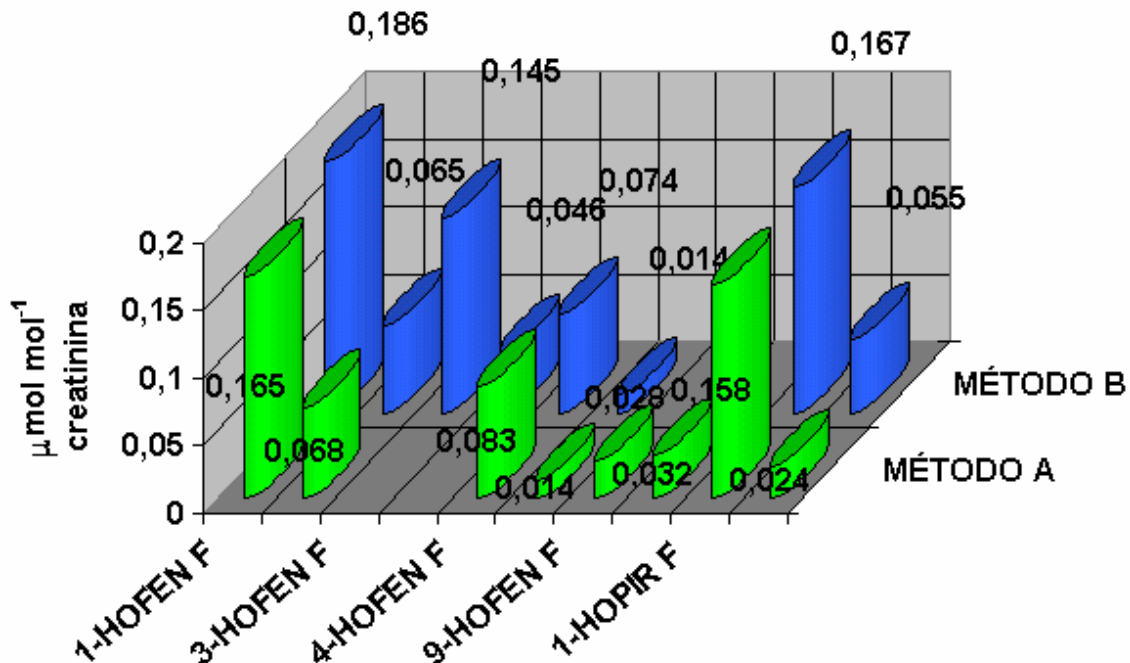


Fig. 4: Resultados de hidroxifenantrenos e hidroxipireno en μmol/mol creatinina para un fumador y un no fumador por los métodos A y B.

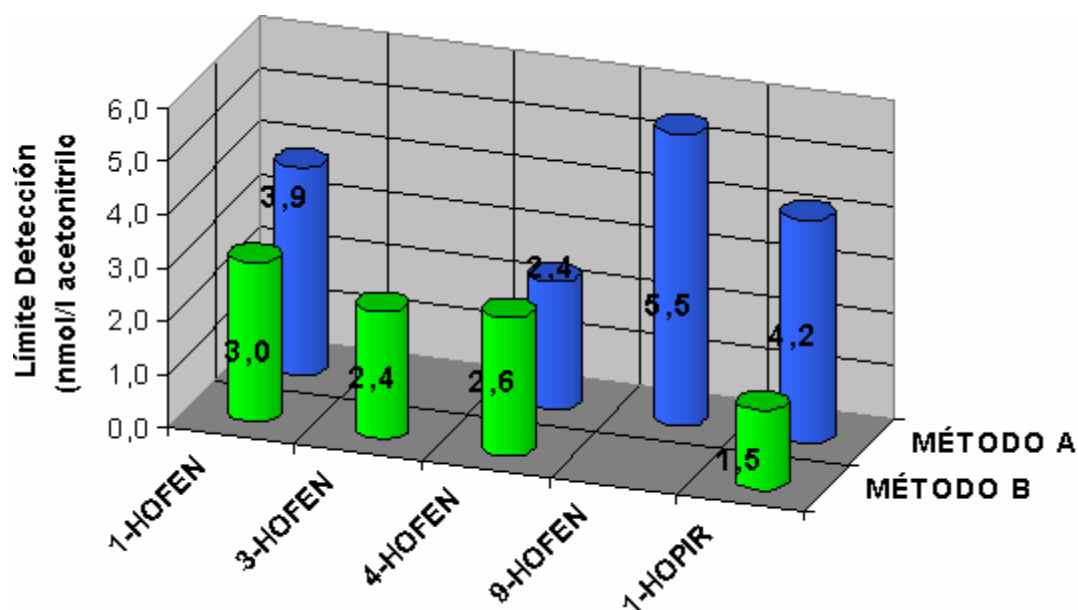


Fig. 5: Límites de detección (nmol/l acetonitrilo) de los hidroxifenantrenos e hidroxipireno obtenidos con los métodos A y B. (HOFEN: hidroxifenantreno, HOPIR: hidroxipireno)

## Conclusiones

1. La técnica HPLC con detección fluorimétrica permite la detección simultánea de los metabolitos monohidroxilados del fenantreno y pireno en orina. En base a estos métodos se puede detectar de forma rutinaria la exposición a HAPs.
2. Se han desarrollado dos métodos complementarios (A y B). Con el método A coeluyen el 2- y 3-hidroxifenantreno y con el B el 2- y 9- hidroxifenantreno. El uso combinado de ambos permite determinar el contenido en orina de 1-, 2-, 3-, 4-, 9- hidroxifenantreno y 1-hidroxipireno.
3. Los límites de detección obtenidos por ambos métodos son comparables para los hidroxifenantrenos. Para el 1-hidroxipireno el método B permite obtener mejores límites de detección.
4. El método B es el más adecuado para una única determinación de los metabolitos de fenantreno y pireno, debido a la baja proporción en orina del 9-hidroxifenantreno (6, 8, 10) y a la menor respuesta de éste frente al 2-hidroxifenantreno.

## Referencias

1. "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans", IARC Monographs, Vol. 63, International Agency for Research on Cancer, Lyon (1995).
2. F.J. Jongeneelen, P.T.J. Scheepers, A. Groenendijk, L. Van Aerts, R.B.M. Anziona, R.P. Bos, S. Veenstra, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 49, 600-607, (1988).
3. W.P. Tolos, P.B. Shaw, L.K. Lowry, Appl. Occup. Environ. Hyg., 5, 303-309 (1990).
4. D. Mielzynska, Z. Braszczyńska, E. Siwinska, E. Smolik, A. Bubak, J.A. Sokal, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 58, 661-666, (1997)
5. R.K. Bentsen, K. Halgard, H. Notø, H.L. Daae, S. Øvrebø, The Science of the Total Environment, 212, 59-67, (1998)
6. G. Grimmer, G. Dettbarn, J. Jacob, Int Arch. Occup. Environ. Health, 65, 189-199, (1993)
7. J. Gündel, C. Mannschreck, K. Btüttner, U. Ewers, J. Angerer, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 31, 585-590 (1996)
8. G. Grimmer, J. Jacob, G. Dettbarn, K. W. Naujack, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 69, 231-239 (1997)
9. J. Angerer, C. Mannschreck, J. Gündel, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 69, 323-331 (1997)
10. J. Jacob, G. Grimmer, G. Dettbarn, Biomarkers, 5, 319-327 (1999)
11. J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington, 1993, pp 100-103