



# Metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en orina: Estudio comparativo de dos métodos cromatográficos para el análisis de 1-hidroxipireno

Póster. XII Congreso Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. Valencia 20-23 de noviembre de 2001.

N. Montes  
M.T. Urbietta  
I. Eguiarte  
Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - INSHT  
cnvminsht@mtas.es

## Introducción.

Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) existen suficientes evidencias de que varios Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son carcinógenos, así como de que algunos compuestos de esta familia aumentan el efecto carcinogénico de otros HAPs, como por ejemplo el pireno, que potencia el efecto del benzo(a)pireno (1, 2).

Estos compuesto penetran en el cuerpo humano a través de las rutas respiratoria, gastrointestinal y dérmica, llegando en algún caso esta última a alcanzar el 70% de la cantidad absorbida (3). Una vez en el interior del organismo, el hígado y otros tejidos metabólicamente activos los transforman en otros compuestos más fácilmente eliminables en orina, entre los que destacan los monohidroxi y dihidroxi derivados.

Hasta hace unos años, la evaluación de la exposición laboral a HAP en diversas operaciones industriales (trabajos de fabricación de gas, baterías de coque, industria del aluminio y procesos de asfaltado) se realizaba únicamente a través de medidas ambientales de estos compuestos, sin embargo, demostrada la contribución que tiene la entrada vía dérmica a la exposición de estos compuestos es necesario completar la evaluación ambiental con el control biológico, bien a través de la cuantificación de estos contaminantes o de sus metabolitos en medios biológicos (sangre u orina) o de la medida de los efectos en el propio organismo.

Para el control biológico del conjunto de los HAPs se ha propuesto la evaluación del 1- hidroxipireno (1-hopir), habiéndose realizado numerosos trabajos al respecto (4).

También se han estudiado otros indicadores biológicos, como los hidroxifenantrenos (hofen), 3-hidroxi(a)pireno, naftoles, etc., aunque el número de trabajos realizados es poco numeroso (5). El pireno es sólo uno de los cientos de hidrocarburos aromáticos policíclicos, y aunque su proporción relativa no es constante, está prácticamente siempre presente en las mezclas de HAPs.

En 1999, se optimizó en nuestros laboratorios un método para la determinación individual del 1-hopir, propuesto como indicador biológico de la exposición a HAPs, y se estudiaron las orinas de 11 personas no expuestas laboralmente, clasificadas en fumadores y no fumadores (6). Posteriormente, se amplió el estudio, optimizando un nuevo método para la determinación simultánea de los derivados monohidroxilados del fenantreno y pireno en orina, que de manera similar se aplicó a 10 voluntarios no expuestos (7).

El objeto de este trabajo es el estudio comparativo de estos dos métodos cromatográficos para el análisis de 1-hidroxipireno en orina, analizando la diferencia de resultados en la determinación individual de 1-hopir y en la evaluación simultánea con los metabolitos monohidroxilados del fenantreno, aplicando ambos métodos a 12 muestras de orina correspondientes a personas no expuestas laboralmente.



## Materiales y métodos.

### Reactivos.

- 1-Hidroxipireno, 98%, Aldrich.
- 1-Hidroxifenantreno, >99%, Promochem.
- 2-Hidroxifenantreno, >99%, Promochem.
- 3-Hidroxifenantreno, >99%, Promochem.
- 4-Hidroxifenantreno, >99%, Promochem.
- 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>), en solución acuosa estabilizada con timerosal, Boehringer Mannheim GmbH, 10 ml.
- Acetonitrilo, para HPLC, grado gradiente, Carlo Erba.
- Metanol, para HPLC, grado gradiente, Carlo Erba.
- Agua purificada y desionizada mediante un sistema Milli-Q-Milli-RO (Millipore (Bedford, MA, USA)).
- Ácido acético, glaciado, Scharlau, calidad HPLC.
- Acetato sódico, Merck, p.a.
- Tamiz molecular, 0.3 nm de tamaño de partícula, Merck.

### Materiales.

- Filtros de 13 mm, 0.45  $\mu$ m, Millex-HV, PVDF Durapore, Millipore.
- Filtros de 4 mm, 0.45  $\mu$ m, Millex-HV, PVDF Durapore, Millipore.
- Jeringas de plástico de tres cuerpos con tapón de émbolo de caucho, 1ml.
- Frascos de plástico para el muestreo de orina.
- Micropipeta automática FinnPipette de tres cuerpos 4-1000  $\mu$ l.
- Micropipeta Gilbson de 2 a 20  $\mu$ l.
- Columnas para extracción sólido-líquido Sep-Pak Vac RC tC-18 (500 mg), Waters.
- Pipetas Pasteur.

### Equipamiento.

- Sistema cromatográfico HPLC, modelo HP1050, con detector de fluorescencia HP1046A, muestreador automático Agilent serie 1100 y estación de trabajo HPLC3D (Serie DOS), Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA).
- Columna cromatográfica LiChroCART LiChrospher R PAH, 250 x 4 mm ID, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Merck.
- Precolumnas LiChroCART LiChrospher R PAH, 4 x 4 mm ID, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Merck.
- Baño con agitación orbital y control de temperatura, SBS 30, Stuart Scientific.
- Sistema de extracción a vacío, Visiprep DL, Supelco.
- Bomba de vacío, Millipore.
- Baño de ultrasonidos, Selecta.

### Procedimiento analítico.

#### *Metodología de muestreo, tratamiento y conservación de las muestras.*

Se eligieron 12 voluntarios sanos no expuestos laboralmente a quienes se les proporcionaron frascos de plástico para recoger las muestras de orina. Éstas se recibieron en el laboratorio, donde se filtraron y clasificaron. Las muestras etiquetadas se congelaron a -25° C hasta su análisis.



### Preparación de muestras de orina.

Tras descongelar las orinas, y mantenerlas en agitación durante 30 minutos, se toman volúmenes de muestra de 5 ml y se añaden 10 ml del tampón ácido acético / acetato 0.2 M, pH = 5.0, comprobándose que el pH final de la muestra resulta ser el del tampón empleado. Se adicionan 75  $\mu$ l del enzima con actividad  $\beta$  -Glucuronidasa/Arilsulfatasa y las muestras se introducen en el baño de agitación orbital a 70 rev. min<sup>-1</sup> y 37°C durante 16 h.

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 y flujo. Para ello, se acondiciona el cartucho con 5 ml de acetonitrilo y 10 ml de agua. A continuación, se adiciona la muestra y posteriormente se limpia el cartucho con 10 ml de agua:acetonitrilo (90:10). La muestra se eluye con 5 ml de acetonitrilo, despreciando las primeras gotas.

Los extractos se secan con tamiz molecular y tras retirar el mismo se evaporan hasta sequedad en el rotavapor a una temperatura del baño de 50°C. Los residuos se reconstituyen en 0.3 ml de acetonitrilo.

### Condiciones cromatográficas.

Las diferentes condiciones cromatográficas para cada uno de los métodos, análisis individual del 1-hopir en orina y análisis simultaneo de monohidroxiderivados del fenantreno y pireno, se detallan en la tabla 1.

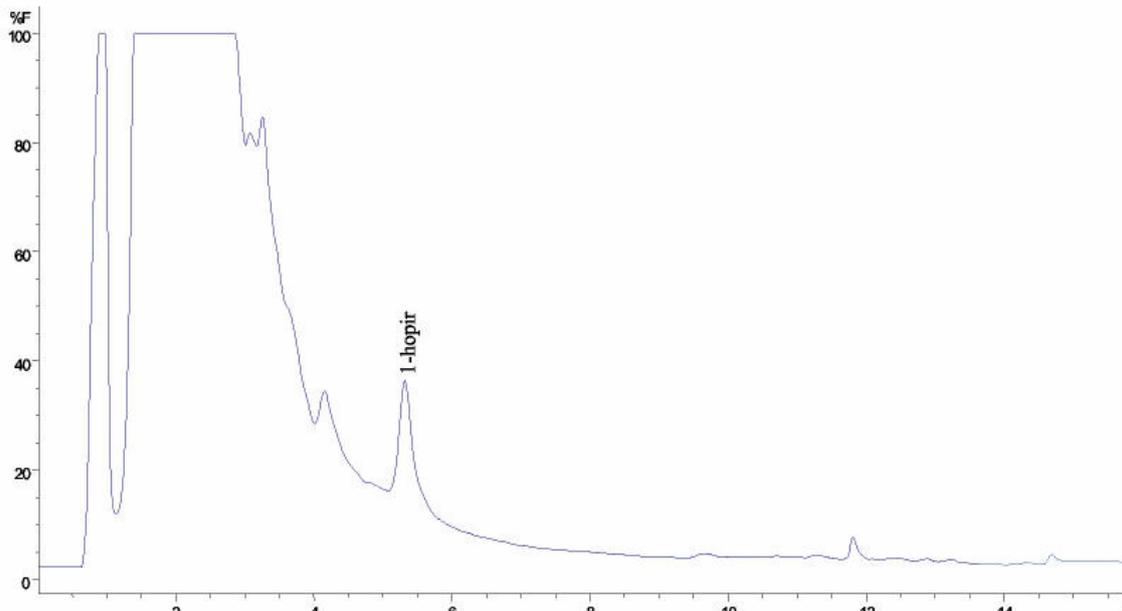
**Tabla 1**  
**Condiciones cromatográficas para los métodos de análisis individual y simultaneo de 1-hopir.**

	Método individual		Método simultaneo	
<b>Caudal</b>	1,4 ml/min		1,0 ml/min	
<b>Temperatura</b>	30°C		40°C	
<b>Eluyente</b>	Acetonitrilo/agua		Metanol/Agua	
<b>Tiempo Análisis</b>	20 min tr 1-hopir = 5,7 min		60 min tr 1-hopir = 27,8 min	
<b>Programa de gradiente</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Acetonitrilo</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Metanol</b>
	0,0	60	0,0	50
	7,5	60	10,0	50
	10,5	95	20,0	70
	12,5	95	30,0	80
	14,0	60	35,0	50
<b>Longitudes de onda</b>	$\lambda_{ex}$ (nm) = 242	(nm) = 388	$\lambda_{ex}$ (nm) = 242	$\lambda_{ex}$ (nm) = 388
<b>Vol. inyección</b>	20 $\mu$ l		20 $\mu$ l	

## RESULTADOS

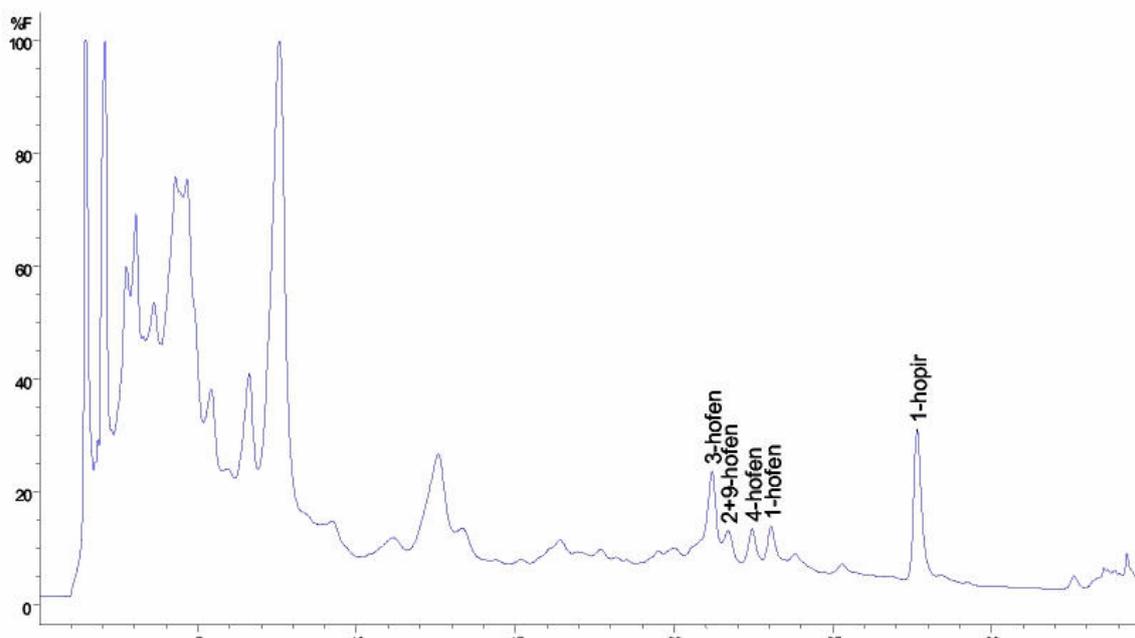
El método cromatográfico para el análisis individual del 1-hopir proporciona un cromatograma con un tiempo de retención para dicho compuesto de 5,7  $\pm$ 0,2 min (fig. 1).

**Fig. 1**  
**Cromatograma de una orina de un fumador no expuesto laboralmente obtenida con las condiciones cromatográficas para el análisis individual de 1-hopir (7,09 nmol / l orina).**



Las condiciones cromatográficas optimizadas para la identificación y cuantificación simultánea de los derivados monohidroxilados del fenantreno y del 1-hopir dan lugar a cromatogramas con tiempos de retención de  $21,2 \pm 0,5$ ;  $21,8 \pm 0,5$ ;  $22,7 \pm 0,6$  y  $23,2 \pm 0,6$  min para el 3-, 2- + 9-, 4- y 1-hofen respectivamente y  $27,8 \pm 0,7$  min para el 1- hopir (Fig. 2).

**Fig. 2**  
**Cromatograma de una orina de un fumador no expuesto laboralmente obtenido con las condiciones cromatográficas para el análisis simultáneo de 1-hopir y 1-,2-,3-y 4-hofen (3,61; 4,80; 1,46; 3,01 y 7,91 nmol / l orina para el 3-, 2+9-, 4-, 1-hofen y 1- hopir respectivamente).**





Las curvas de calibrado para 1-hopir en ambos métodos se construyeron a partir de análisis duplicados de cada concentración, en un intervalo entre 2,48 y 764,68 nmol/l acetonitrilo, representando la altura del pico frente a la concentración. Las ecuaciones de las rectas, regresiones y los límites de detección calculados a partir de éstas según el criterio de Miller y col. (8), se encuentran recogidas en la tabla 2. Las curvas de calibrado para los hofen en las condiciones cromatográficas para el análisis simultáneo se construyen de la misma forma y presentan unas regresiones similares a las de los hidroxipireno (datos no incluidos en esta comunicación).

**Tabla 2**  
**Ecuaciones de las rectas de calibrado, regresión y límites de detección calculados según Miller y col (0,0 + 3.sx/y) para el 1-hopir, obtenidos para cada una de los métodos de análisis.**

Método Individual	Método simultáneo
Altura = 0,094 * Concen. (nmol/l acetonitrilo) + 0,041	Altura = 0,105 * Concen. (nmol / l acetonitrilo) + 0,028
$r^2 = 0,999$	$r^2 = 0,997$
L.D. = 0,06 nmol / l orina	L.D. = 0,12 nmol / l orina

La reproducibilidad en el día, en términos de desviación estándar relativa, para unas concentraciones de 17,08 nmol 1-hopir / l acetonitrilo en el método de análisis individual y 22,09 nmol 1-hopir / l acetonitrilo en el caso del análisis simultáneo del 1- hopir con los hidroxifenantrenos, resultó ser de 1,1% y 2,6% respectivamente (n = 6).

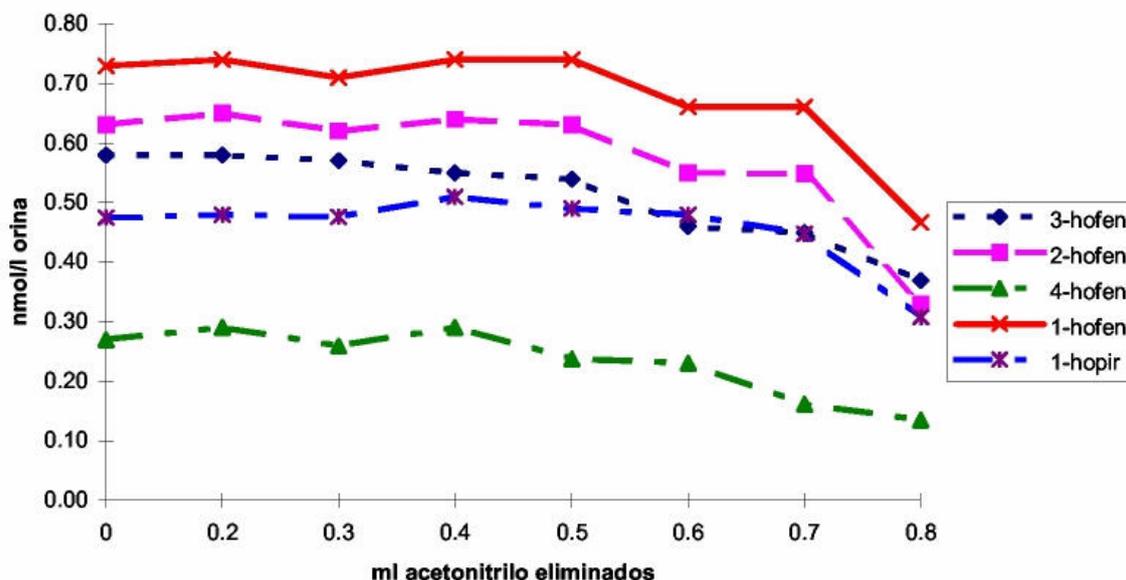
Se recogieron muestras puntuales de orina de 12 fumadores no expuestos laboralmente, que se trataron como se indica anteriormente, calculando empíricamente el volumen de acetonitrilo despreciado en el último paso de limpieza de la columna, (0,5 ml acetonitrilo), para eliminar las impurezas que eluyen inicialmente sin pérdidas de los analitos en estudio, (fig. 3). Posteriormente se analizaron por ambos métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. El coeficiente de correlación obtenido para los dos métodos resultó ser de  $r = 0,998$ , significativa al nivel 0,01. Así mismo se calculó la correlación entre el 1-hopir y la suma total de los hofen, obteniéndose un valor de  $r = 0,608$ .



**Tabla 3**  
**Estudio comparativo de las concentraciones de 1-hopir y  $\Sigma$ -hofen, expresadas en nmol / l orina, de 12 muestras de orinas pertenecientes a fumadores no expuestos laboralmente, analizadas según las condiciones cromatográficas para el análisis individual del 1-hidroxipireno y para el análisis simultáneo del 1-hopir con los hidroxiderivados del fenantreno.**

Muestra	Método individual nmol/l orina	Método simultáneo nmol/l orina	
	1-hopir	1-hopir	$\Sigma$ -hofen
1	3,90	4,27	12,89
2	5,23	5,74	12,22
3	7,04	7,91	12,88
4	1,62	1,81	9,92
5	1,68	2,09	10,79
6	1,50	1,68	9,39
7	2,03	2,12	11,64
8	2,07	2,11	11,40
9	2,34	2,39	12,25
10	2,20	2,26	11,95
11	2,09	2,14	11,88
12	2,19	2,35	12,23

**Fig. 3**  
**Concentración en nmol/l -1 orina de 1-, 2-, 3-, 4-hofen y 1-hopir de una muestra de orina de fumador, en función del volumen de acetonitrilo despreciado en el paso anterior a la extracción de los solutos de interés.**



## Conclusiones

Los dos métodos comparados en este estudio son igualmente válidos para el análisis del 1-hopir, al mostrar una muy buena correlación entre ambos ( $r = 0,998$ ), si bien el método individual presenta una sensibilidad y reproducibilidad ligeramente mayor que el método simultáneo con los hofen. (LD = 0,06 y 0,12 nmol/l orina para análisis individual y simultáneo respectivamente).

Igualmente ambos son de aplicación para determinar el contenido de 1-hopir en orina, tanto en personas poco o no expuesta como en aquellas que trabajan con una alta exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos, como pueden ser los trabajadores de hornos de coque, destilación de alquitranes, industria primaria del aluminio, etc., debido al alto rango de linealidad que presentan las curvas de calibrado (2,48 – 764,68 nmol/l acetonitrilo).

Las condiciones cromatográficas para la determinación individual del 1-hopir proporcionan un método rápido para el análisis rutinario de la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos, al presentar un tiempo de retención de  $5,7 \pm 0,2$  min, frente al tiempo de retención obtenido en el método simultáneo para este mismo compuesto ( $27,8 \pm 0,7$  min).

El estudio simultáneo de los hidroxifenantrenos y del hidroxipireno puede mejorar la estimación de la exposición a HAPs, ya que como se ha indicado, la proporción relativa del pireno en las mezclas de HAPs no es constante, obteniéndose de esta forma información adicional.

## Bibliografía

1. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1, IARC Monographs, Vol. 32, International Agency for Research on Cancer, Lyon, (1983).
2. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs, Vol. 63, International Agency for Research on Cancer, Lyon, (1995).
3. J. G. M. Van Rooij, M. M. Bodelier-Bade, F. J. Jongeneelen, Bri. J. ind. Me., 19, 623-632, (1993).
4. F. J. Jongeneelen, Ann. occup. Hyg., 45, 3-13, (2001).
5. J. Gündel, J. Angerer, Journal of Chromatography B, 738, 47-55, (2000).
6. M. T. Urbieta, I. Eguiarte, E. Uria, 23rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, PB8/52, (1999).



7. M.T. Urbieto, I. Eguiarte, N. Montes, 24th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques, BIO-P54, (2000).
8. J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington, 100-103, (1993).

(c) INSHT