

Determinación de los ácidos fenilgloxílico, mandélico, hipúrico y orto y para - metilhipúrico en orina - Método de fase reversa con detector de ultravioleta / Cromatografía líquida de alta resolución

MTA/MB-022/A95

Palabras clave: *Ácido fenilgloxílico, ácido mandélico, ácido hipúrico, ácido orto-metilhipúrico, ácido para-metilhipúrico, orina, cromatografía líquida.*

PRESENTACIÓN

Los ácidos fenilgloxílico y mandélico son metabolitos característicos de la exposición a estireno y los isómeros orto, meta y para del ácido metilhipúrico lo son de la exposición a los mismos isómeros de xileno. El ácido hipúrico, además de metabolito indicador de la exposición a tolueno, es un componente habitual de la orina así como un metabolito correlacionable con la exposición a tolueno. Aunque no es habitual una exposición conjunta a todos estos compuestos, el método que se presenta permite la determinación de estos metabolitos, siendo aplicable evidentemente a cada uno de ellos por separado.

El método "*Determinación de ácido fenilgloxílico, ácido mandélico, ácido hipúrico y ácidos metilhipúricos en orina - Método de cromatografía líquida en fase reversa con detector de ultravioleta*" es un **MÉTODO ACEPTADO** por el [Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo \(INSHT\)](#). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende un método evaluado por 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 profesiones 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

- 3.1. Agua destilada o desionizada
- 3.2. Metanol para cromatografía líquida
- 3.3. Ácido acético glacial para cromatografía líquida
- 3.4. Ácido clorhídrico concentrado
- 3.5. Ácido fenilgloxílico
- 3.6. Ácido mandélico
- 3.7. Ácido hipúrico
- 3.8. Ácido para-metilhipúrico
- 3.9. Ácido orto-metilhipúrico
- 3.10. Modificador de matriz
- 3.11. Disolución de trabajo
- 3.12. Eluyente

4. APARATOS Y MATERIAL

- 4.1. Frascos de polietileno
- 4.2. Viales
- 4.3. Tapones con septum
- 4.4. Material de vidrio de borosilicato 3.3.
- 4.5. Filtros Millipore tipo HAWP
- 4.6. Filtros Millipore tipo FH
- 4.7. Columna
- 4.8. Precolumna
- 4.9. Jeringas
- 4.10. Filtros adaptables
- 4.11. Bomba de vacío
- 4.12. Equipo de filtración
- 4.13. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución

5. TOMA DE MUESTRAS

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- 6.1. Limpieza de material
- 6.2. Preparación de la muestra
- 6.3. Preparación de patrones y curva de calibración
- 6.4 Determinación

7. CÁLCULOS

- 7.1. Determinación de la concentración de pos ácidos fenilgloxílico, mandélico, hipúrico y metilhipúricos en la curva de calibración

8. PRECISIÓN

9 BIBLIOGRAFÍA

Anexo A Determinación de creatinina en orina



1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de los ácidos fenilgloxílico, hipúrico, mandélico y los isómeros orto y para del ácido metilhipúrico en orina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los intervalos de concentración siguientes:

0,02 g/l a 0,50 g/l de ácido fenilgloxílico (Nº CAS 611-73-4)

0,08 g/l a 2,00 g/l de ácido mandélico (Nº CAS 90-64-2)

0,10 g/l a 4,00 g/l de ácido hipúrico (Nº CAS 495-69-2)

0,12 g/l a 3,00 g/l de ácido o-metilhipúrico (Nº CAS 42013-20-7)

0,12 g/l a 3,00 g/l de ácido p-metilhipúrico (Nº CAS 27115-50-0)

El método es aplicable al seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas a estireno, tolueno y los isómeros del xileno. Sin embargo, la cantidad de ácido hipúrico en la orina de diferentes personas puede variar en función de la dieta. Por lo tanto, la concentración de ácido hipúrico debe considerarse como orientativa de la exposición laboral a tolueno.

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 recogen al final de turno de trabajo en frascos de polietileno y se acidifican hasta pH=1 con ácido clorhídrico concentrado. Tras la filtración de la orina, la determinación de los ácidos presentes en ella se efectúa directamente por HPLC en fase reversa utilizando para ello una columna de sílice funcionalizada con octadecilsilano (C-18). La detección de dichos compuestos se realiza mediante un detector de ultravioleta-visible de diodos de Array a 225 y 254 nm.

3. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados serán de calidad "para análisis" como mínimo. Los disolventes cromatográficos además de tener la pureza adecuada deben ser filtrados y desgasificados.

3.1. Agua destilada o desionizada

El agua será de calidad 1 de acuerdo con la Norma ISO 3696 (9.10.)

3.2. Metanol para cromatografía líquida

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA FÁCILMENTE INFLAMABLE Y TÓXICA. Frases 22-55. Frases (S): 3-15-21-53108. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9.).

3.3. Ácido acético glacial para cromatografía líquida

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 10-35. Frases (S): 2-23-26. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9.).

3.4. Ácido clorhídrico concentrado

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37 Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9.).

3.5. Ácido fenilgloxílico

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA NOCIVA E IRRITANTE. Frases (R): 20. Frases (S): 24. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9.).

3.6. Ácido mandélico

3.7. Ácido hipúrico

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA NOCIVA E IRRITANTE. Frases (R): 22-24/25. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9).

3.8. Ácido para-metilhipúrico

3.9. Ácido orto-metilhipúrico

3.10. Helio

3.11. Disolución de trabajo

Se pesan aproximadamente 0,025 g de ácido fenilgloxílico (3.5.); 0,100 g de ácido mandélico (3.6.); 0,200 g de ácido hipúrico (3.7.) y 0,150 g de cada uno de los ácidos metilhipúricos (3.8.) y (3.9.). Se disuelven en la cantidad mínima posible de metanol con la ayuda de un baño de ultrasonidos y se afora con agua hasta un volumen total de 50 ml.

3.12. Eluyente

Se depositan 50 ml de metanol (3.2.) filtrado (4.6.) y 10 ml de ácido acético glacial (3.3.) en un matraz de 1000 ml. Se completa este volumen con agua filtrada (4.5.) y se desgasifica mediante una corriente de helio.

NOTA: Similares resultados se obtienen utilizando como eluyente una disolución de dihidrógenofostato de potasio 5 mM en acetonitrilo al 10%.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Frascos de polietileno para la toma de muestras de 100 ml de capacidad aproximadamente.

4.2. Viales de 2 ml de vidrio.

4.3. Tapones con septum para los viales

4.4. Material de vidrio de borosilicato 3.3. de acuerdo con la norma ISO 3585. (9.12.).

4.5. Filtros Millipore tipo HAWP, HA de 0,45 µm 47 mm, para filtración de disolventes orgánicos.

4.6. Filtros Millipore tipo FH de 0,5 µm 47 mm, para la filtración de disolventes orgánicos.

4.7. Columna rellena de sílice funcionalizada con octadecilsilano de 10 cm x 4,6 mm.

4.8. Precolumna de sílice funcionalizada con octadecilsilano.



4.9. Jeringas desechables de 10 ml.



4.10. Filtros adaptables a jeringas de 0,45 µm para la filtración de la orina.



4.11. Bomba de vacío, para la filtración de disolventes.



4.12. Equipo de filtración para disolventes cromatográficos.



4.13. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector de Ultravioleta-Visible (UV-VIS) de diodos de Array.



5. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras de orina se realiza al final de cada turno. Las muestras son acidificadas mediante adición de ácido clorhídrico hasta alcanzar pH=1 y se conservan a 4°C en nevera hasta el momento de su análisis, que se realizará preferentemente antes de 8 días a partir de la toma de muestra (tabla 2).



6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza de material

6.1.1. El material de vidrio utilizado en el análisis, después de lavado con un detergente, debe mantenerse sumergido varios minutos en ácido nítrico al 50% (VN) y ser posteriormente enjuagado con agua (3.1.)

6.1.2. Se utilizarán 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 la orina son de un solo uso. Las jeringas también serán desechables o estarán completamente limpias y secas.



6.2. Preparación de la muestra

6.2.1. Antes de proceder al análisis se permitirá que la muestra alcance la temperatura ambiente.

6.2.2. La orina se homogeneiza por agitación y se filtra utilizando un filtro de 0,45 µm (4.10.) para evitar que pasen a la columna sólidos que puedan estropearla.

6.2.3. Se deposita en el vial (4.2.) aproximadamente 1 ml de orina filtrada (6.2.2.) y se inyecta directamente en el cromatógrafo sin ningún tratamiento adicional.



6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. Disolución de trabajo. Se prepara la disolución tal como se indicó en 3.11. Las concentraciones resultantes serán de 0,5 g/l de ácido fenilgloxílico, 2 g/l de ácido mandélico, 4 g/l de ácido hipúrico y 3 g/l para los ácidos orto y para-metilhipúrico

6.3.2. A partir de la disolución de trabajo y por las diluciones apropiadas con agua (3.1.) se preparan al menos seis patrones de calibración que deberán cubrir el intervalo de concentraciones de las muestras a analizar y encontrándose, siempre que sea posible, dentro del intervalo lineal de calibración.

6.3.3. El análisis de las muestras, patrones y blanco se llevará a cabo inyectando en la columna 2 µl de cada uno de ellos por cuadruplicado. Para la cuantificación se utiliza el valor medio de las cuatro inyecciones.

6.3.4. Curva de calibración. Se traza una curva de calibración para cada analito representando las lecturas en altura de pico obtenidas para los patrones de calibración frente a sus respectivas concentraciones en g/l.

6.4 Determinación

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

Columna:	de sílice funcionalizada con octadecilsilano de 10 cm x 4,6 mm
Precolumna:	de sílice funcionalizada con octadecilsilano.
Caudal:	1 ml/minuto
Temperatura:	40 °C
Eluyente:	5% metanol, 1 % ácido acético en agua (véase 3.12.).
Vol. de inyección:	2 µl

La detección de los ácidos fenilgloxílico, hipúrico y metilhipúricos se realiza a una longitud de onda de 254 nm y la del ácido mandélico a 225 nm.

7. CÁLCULOS

7.1. Determinación de la concentración de pos ácidos fenilgloxílico, mandélico, hipúrico y metilhipúricos en la curva de calibración

La concentración de los citados ácidos en cada muestra, expresada en gramos por litro de orina, se determina directamente por interpolación de la lectura obtenida en la curva de calibración correspondiente a cada compuesto.

Los resultados pueden referirse a la cantidad de creatinina presente en la muestra (9.8.) mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g analito} / \text{g creatinina} = \frac{\mu\text{g analito} / \text{l orina}}{\text{g creatinina} / \text{l orina}}$$

La determinación de creatinina se describe en el [anexo A](#)

8. PRECISIÓN

La precisión estimada para este método, expresada en términos de coeficiente de variación, es inferior al 5%, excepto para las determinaciones a bajas concentraciones de ácido fenilgloxílico, que está en torno al 10% debido a las interferencias que se presentan. (tablas 1 y 2).

El sesgo del método ha sido evaluado utilizando muestras comerciales de concentración garantizada. Los resultados de dicha evaluación se encuentran en la tabla 1.

TABLA 1
Prueba intralaboratorio. Cálculo del sesgo y de la precisión intralaboratorio

Material de Referencia	Compuesto	Concentrac. Certificada (mg/l)	Resultados obtenidos		
			* Concentrac. (mg/l)	C.V. (%)	Sesgo (%)
BIORAD I	Fenilgloxílico	56,2 ± 11,2	58,37	9,69	-14,77
	Mandélico	147 ± 57	172,21	2,24	+17,14

	Hipúrico	327 ± 66	344,03	0,29	+5,20
BIORAD II	Fenilgloxílico	245 ± 49	233,04	3,21	-4,88
	Mandélico	283 ±57	309,88	1,27	+9,50
	Hipúrico	678 ± 136	682,35	0,57	+0,64

* Cada resultado es la media de seis muestras analizadas.

NOTA - Para el cálculo del sesgo de un método analítico deben ser utilizados Materiales de Referencia Certificados (MRC). Cuando no se disponga de ellos y se utilicen otros Materiales de Referencia (MR), como los patrones comerciales de concentración garantizada, el valor del sesgo calculado a partir de ellos se considerará únicamente como indicativo (9.14).

TABLA 2
Estudio de estabilidad de las muestras

Muestra 1

FECHA ANÁLISIS	TEMPERATURA	COMPUESTO	Concentr. * g/l	CV	DIF.
Inmediato	Ambiente	Fenilgloxílico	293,96	5,50	
		Mandélico	835,74	5,34	
		Hipúrico	540,90	5,76	
8 días	4°C	Fenilgloxílico	304,16	4,32	+3,47
		Mandélico	902,64	8,56	+8,00
		Hipúrico	571,36	3,51	+5,63
	-18°C	Fenilgloxílico	303,70	2,56	+3,31
		Mandélico	929,60	3,47	+11,23
		Hipúrico	561,34	1,53	+3,78
15 días	-4°C	Fenilgloxílico	252,66	1,47	-14,05
		Mandélico	857,07	0,60	+2,55
		Hipúrico	500,14	0,83	-7,53
	-18°C	Fenilgloxílico	263,97	4,43	-10,20
		Mandélico	905,59	2,46	+8,36
		Hipúrico	509,59	3,08	-5,79

Muestra 2

FECHA ANÁLISIS	TEMPERATURA	COMPUESTO	Concentr. * g/l	CV	DIF.
Inmediato	Ambiente	Fenilgloxílico	494,97	1,51	
		Mandélico	950,44	1,57	
		Hipúrico	356,94	0,69	
8 días	4°C	Fenilgloxílico	498,22	0,38	+0,66
		Mandélico	1087,8	3,48	+14,45
		Hipúrico	353,19	0,41	-1,05
	-18°C	Fenilgloxílico	502,18	1,86	+1,45
		Mandélico	1108,7	0,93	+16,64
		Hipúrico	360,27	0,89	+0,93
		Fenilgloxílico	426,02	1,08	-13,93

15 días	-4°C	Mandélico	847,20	0,72	-10,86
		Hipúrico	310,22	0,69	-13,08
	-18°C	Fenilglioxílico	433,41	0,95	-12,43
		Mandélico	867,11	0,35	-8,76
		Hipúrico	313,76	3,04	-12,09

* Cada concentración es el valor medio de seis muestras analizadas.

9 BIBLIOGRAFÍA

- 9.1. R. Tardif; J.Brodeur ; G.L.Plaa. **Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Hippuric Acid and ortho-, meta-, and paramethylhippuric Acids in Urine**. Journal of Analytical Toxicology, vol. 13 November/December 1989.
- 9.2. M.Buratti; O.Pellegrino; G.Caravelli; DYaiz ; C.Valla; A.Colobbi. **Applicazioni della cromatografia liquida ad alte prestazioni nell' analisi dei metaboliti urinari dei solventi aromatici** Med. Lav. ; 80, 3:254-263 (1989).
- 9.3. Masana Ogata; Toyohiro Taguchi. **Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid Chromatography**. Int. Arch. Occup. Environ. Health 59: 263-272 (1987).
- 9.4. Masana Ogata; Reiko Sugiara. **High Performance Liquid Chromatographic Procedure for quantitative determination of urinary phenilglioxilic, mandelic, and hippuric acids as indices of styrene exposure** Int. Arch. Occup. Environ Health 42,11-19 (1978).
- 9.5. INSHT. **Determinación de ácido fenilglioxílico, mandélico, hipúrico y metilhipúrico en orina. Método directo / Cromatografía Líquida**. MTA/103(1)/P90.
- 9.6. INSHT. **Determinación del ácido hipúrico en orina. Método Directo / Cromatografía líquida** . MTA/104(1)/P90.
- 9.7. A. Astier ; A. M. Deutsch. **High-performance Liquid chromatographic determination of hippuric in human urine**. Journal of Chromatography, 189 (1980) 88-93.
- 9.8. B. Harvey, : Elkins. **Concentration adjustments in urinalysis**. Am. Ind. Assoc. J. 35, 559-565, (1974).
- 9.9. Real Decreto 2216/1985 de 23.10 (Presid.. BB.OO.E. 27-11-1985, rect. 9-5-1986) **Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas**. Actualizado por Orden de 9-12-92 (M. Relac. Cortes B.O.E. 17-12-92).⁽¹⁾
- 9.10. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio**. Especificaciones.
- 9.11. ISO 8655, "Partes 1 a 4. **Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo**.
- 9.12. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes**. Propiedades del vidrio borosilicatado.
- 9.13. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en Higiene Industrial**. MTA/PV-III/90.
- 9.14. Guide ISO 30. **Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence**. 1981.

Anexo A Determinación de creatinina en orina

A.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método se basa en la medida de la velocidad con la cual la creatinina reacciona en medio alcalino con el ácido pícrico (Reacción de Jaffé), formando un compuesto coloreado, que se determina espectrofotométricamente a 520 nm.

A.2. REACTIVOS

Todos los reactivos deben tener como mínimo la especificación "para análisis". El agua utilizada será de grado 2 de pureza como mínimo, de acuerdo con ISO 3696 (9.10.).

A.2.1. Hidróxido de sodio

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R) 35. Frases (S) 2-26- 37/39. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9).



A.2.2. Ácido pícrico

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA Y EXPLOSIVA. Frases (R) 2-4-23/24/25. Frases (S) 28-35-37-44. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9).



A.2.3. Ácido clorhídrico mín 30%

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frase (R) 34-37. Frases (S) 2-26. Real Decreto 2216/1985⁽¹⁾ (9.9).



A.2.4. Creatinina



A.2.5. Disolución de NaOH 0,4 N

Se pesan 16 g de NaOH disolviendo y aforando a 1 litro con agua.



A.2.6. Disolución de ácido pícrico

Se disuelven 2,0000 g de ácido pícrico en agua, atorando a 1 litro.



A.2.7. Patrón de creatinina (1 mg/ml)

Se pesa 1,0000 g de creatinina. Se trasfiere a un matraz aforado de 1 litro con ayuda de un pequeño volumen de agua. Se añaden 8,5 ml de ácido clorhídrico y se agita la disolución completando el volumen con agua. Estable al menos un mes.



A.3. APARATOS Y MATERIAL

A.3.1. Espectrofotómetro o colorímetro capaz de leer a 520 nm.



A.3.2. Cronómetro.



A.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

A.4.1. Se diluye la orina con agua 1 ---->100.



A.4.2. Se añaden 0,5 ml de la orina diluida a 1 ml de la disolución de hidróxido sódico. Se mezcla y se deja estabilizar durante cinco minutos a temperatura ambiente.



A.4.3. Se añade 1 ml de la disolución de ácido pícrico. Se mezcla y se trasvasa inmediatamente a la cubeta del espectrofotómetro y después de exactamente 1 minuto se mide la absorbancia (A_1) a 520 nm. Exactamente 5 minutos después de la primera medida se vuelve a medir la absorbancia (A_2) a 520 nm.

A.4.4. Se procede análogamente con 0,5 ml de la disolución patrón de creatinina (A.2.7.).

La reacción de la creatinina con el ácido pícrico es muy sensible a la temperatura por lo que todas las muestras y patrones deben estar a la misma temperatura. Cuando dicha temperatura sea superior a 30°C, la primera absorbancia debe ser leída a los 30 segundos.

A.5. CÁLCULOS

La creatinuria se calcula según las siguientes ecuaciones:

$$C \text{ (mg creatinina/100 ml orina)} = \frac{A_2 - A_1}{A_{p2} - A_{p1}} \times 100$$

A_2 y A_1 son las absorbancias de la muestra después de 5 minutos y 1 minuto respectivamente de comenzar la reacción (A.4.3.).

A_{p2} y A_{p1} son las absorbancias correspondientes al patrón de creatinina.

La concentración de creatinina en gramos por litro de orina se obtiene según la siguiente expresión:

$$C \text{ (g creatinina/l)} = \frac{\text{(mg creatinina/100 ml)}}{100}$$

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 - 9 44 990 543 Fax 944 990 678

Correo electrónico.- cnvminsht@mtas.es

ADENDA

Revisión normativa

Las disposiciones siguientes han sufrido modificaciones después de la edición de este método en formato papel:

⁽¹⁾ Real Decreto 2216/1985: Derogado por el [Real Decreto 363/1995](#)