

## **DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE 1-HIDROXIPIRENO, 1-, 2+9-, 3-, 4- HIDROXIFENANTRENOS EN ORINA— MÉTODO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE/CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

**MTA/MB – 028/A10**



MINISTERIO  
DE TRABAJO  
E INMIGRACIÓN



INSTITUTO NACIONAL  
DE SEGURIDAD E HIGIENE  
EN EL TRABAJO

**Organismos participantes en el Programa Nacional de Normalización de Métodos de Toma de Muestra y Análisis:**

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
  - Centro Nacional de Condiciones de Trabajo - Barcelona
  - Centro Nacional de Medios de Protección - Sevilla
  - Centro Nacional de Nuevas Tecnologías - Madrid
  - Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya

**Coordinación:**

Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya

**Edita:**

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo  
C/ Torrelaguna, 73 - 28027 MADRID



## DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE 1-HIDROXIPIRENO, 1-, 2+9- 3-, 4-HIDROXIFENANTRENOS EN ORINA – MÉTODO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE / CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

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

### 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación simultánea de determinados hidroxiderivados de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HO-HAPs) como 1-hidroxipireno (1-HP), 1-hidroxifenantreno (1-HF), 2-hidroxifenantreno (2-HF), 3-hidroxifenantreno (3-HF), 4-hidroxifenantreno (4-HF) y 9-hidroxifenantreno (9-HF) en orina, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente (HPLC-F) en el intervalo de concentración 0,1-12 nmol/l de orina. No obstante, el intervalo de trabajo puede ser mayor, al no observarse fenómenos de falta de linealidad en la recta de calibración.

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

Se considera como interferencia cualquier otro compuesto orgánico, que presente el mismo o próximo tiempo de retención que los compuestos propuestos, en las condiciones de operación descritas en este método. Estas interferencias pueden minimizarse seleccionando las condiciones y columnas cromatográficas adecuadas (9.1-9.13).

### 2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Una alícuota de orina se hidroliza enzimáticamente durante 18 horas a 37 °C y pH 5, ajustado con un tampón acético/acetato 0,2 M. Tras un proceso de limpieza de la muestra mediante extracción sólido-líquido y de evaporación del disolvente, el residuo se reconstituye en acetonitrilo. Los HO-HAPs se determinan mediante cromatografía líquida de fase inversa con detección fluorescente utilizando un programa de gradiente en la composición de la fase móvil.

Si fuera necesario, los valores obtenidos se corrigen en función de la concentración de creatinina hallados en las diferentes orinas, con el fin de minimizar los fenó-

menos de dilución o saturación de las mismas. La concentración de creatinina en la orina puede determinarse empleando un método de cromatografía líquida con detección ultravioleta-visible (9.14).

### 3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

**3.1. Acetonitrilo grado gradiente** para cromatografía líquida. [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N] N° CAS 75-05-8.

NOTA:

*Líquido inflamable 2; Frases (H): 225. Frases (P): 210-233-240-241-242-243-280-303+361+353-403+235-501*

*Toxicidad aguda 4; Frases (H): 302-312-332. Frases (P): 261-271-304+340+312*

*Irritante ocular 2; Frases (H): 319. Frases (P): 264-280-305+351+338-337+313. Reglamento (CE) 1272/2008 (9.15).*

**3.2. Acetato sódico**

**3.3. Ácido acético**, glaciado, para cromatografía líquida. [C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>] N° CAS 64-19-7.

NOTA:

*Líquido inflamable 3; Frases (H): 226. Frases (P): 210-233-240-241-242-243-280-303+361+353-403+235-501*

*Corrosivo para la piel 1A; Frases (H): 314; Frases (P): 260-264-280-301+330+331-303+361+353-363-304+340-310-321-305+351+338-405-501. Reglamento (CE) 1272/2008 (9.15).*

**3.4. Agua ultrapura**, calidad 1 de acuerdo con ISO 3696 (9.16).

**3.5. Enzima con actividad β-Glucuronidasa/Arilsulfatasa obtenido de *Helix pomatia*** (100 000 Fishman U/ml, 800 000 Roy U/ml), en solución acuosa estabilizada con timerosal.

**3.6. Helio**, calidad N-50.

**3.7. 1-Hidroxipireno**, Peso molecular: 218,26, disolución 10 mg/l acetonitrilo.

*PRECAUCIÓN: disolución que contiene acetonitrilo como disolvente*

**3.8. 1-Hidroxifenantreno**, Peso molecular: 195,23, disolución 10 mg/l acetonitrilo.

*PRECAUCIÓN: disolución que contiene acetonitrilo como disolvente*

**3.9. 2-Hidroxifenantreno**, Peso molecular: 195,23, disolución 10 mg/l acetonitrilo.

*PRECAUCIÓN: disolución que contiene acetonitrilo como disolvente*

**3.10. 3-Hidroxifenantreno**, Peso molecular: 195,23, disolución 10 mg/l acetonitrilo.

*PRECAUCIÓN: disolución que contiene acetonitrilo como disolvente*

**3.11. 4-Hidroxifenantreno**, Peso molecular: 195,23, disolución 10 mg/l acetonitrilo.

*PRECAUCIÓN: disolución que contiene acetonitrilo como disolvente*

**3.12. Tamiz molecular**, 0,3 nm de tamaño de partícula.

**3.13. 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 glacial, enrasándose a 1 l con agua (3.4).

**3.14. Disolución mezcla de 1-hidroxipireno y 1-, 2-, 3-, 4-hidroxifenantreno en acetonitrilo (de aproximadamente 0,5 µmol/l acetonitrilo)**. Se toman 10 µl de las disoluciones 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11 y se llevan a un volumen final de 1 ml con acetonitrilo. Se pesan las disoluciones y se recalculan sus concentraciones.

**NOTA:** Todas las disoluciones se preparan llevando a cabo un control gravimétrico (con balanza de precisión) de las mediciones volumétricas. Este control gravimétrico mejora la calibración y por ende la calidad de los resultados analíticos. Alternativamente las disoluciones pueden ser preparadas utilizando únicamente microjeringas y material volumétrico calibrado.

## 4. APARATOS Y MATERIAL

**4.1. Frascos de polietileno** para el muestreo de orina.

**4.2. Tapones** con septum para los viales.

**4.3. Viales** de 1,5 ml de capacidad de color topacio.

**4.4. Jeringas Hamilton** o similar de 10, 25, 50 y 100 µl de acuerdo con la norma ISO 8655 (9.17).

**4.5. Material de vidrio** de borosilicato de color topacio de acuerdo con la norma ISO 3585 (9.18).

**4.6. Pipetas Pasteur**

**4.7. Filtros Millex-HV**, de tamaño de poro 0,45-µm, Milipore (o similar).

**4.8. Jeringas** desechables de 10 y 1 ml.

**4.9. Micropipetas automáticas** de 100-1000 µl de acuerdo con la norma ISO 8655 (9.17).

**4.10. Cartuchos para extracción en fase sólida**, Sep-Pak® Vac RC tC-18 (500 mg), Waters o similar.

**4.11. Bomba de vacío**

**4.12.1. Rotavapor** Heidolph VV2000 con accesorio ACTEvap para 16 viales de 22 ml, Advanced Chemtech (o similar).

**4.12.2. Concentrador** Eppendorf 5301 con sistema de vacío y control de temperatura (o similar).

**4.13. Sistema de extracción a vacío**, Visiprep DL, Supelco (o similar).

**4.14. Baño de ultrasonidos**

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

**4.16. Balanza** capaz de pesar 0,01 mg.

**4.17. Precolumnas**, LiChroCART® LiChrospher® PAH, 4 x 4 mm ID, 5 µm de tamaño de partícula, Merck o similar.

**4.18. Columna cromatográfica:** cartucho LiChroCART® LiChrospher® PAH, 250 x 4 mm ID, 5 µm de tamaño de partícula, Merck o similar.

**4.19. Sistema cromatográfico HPLC** con bomba cuaternaria modelo HP1050, compartimento termostático Agilent serie 1100, muestreador automático Agilent serie 1100, detector de fluorescencia Agilent serie 1100 y estación de trabajo Agilent ChemStation, Agilent Technologies u otro equipo con prestaciones similares.

## 5. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de orina se recogen en frascos de polietileno y se conservan a 4 °C hasta el momento de su análisis que se efectuará en un periodo no superior a 7 días desde la toma de muestra.

## 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 se aclara con agua (3.4).

6.1.2. Se utilizan viales, filtros y pipetas Pasteur desechables.

## 6.2. Preparación de las muestras

### 6.2.1. Hidrólisis enzimática

6.2.1.1. Las muestras de orina se llevan a temperatura ambiente. Se toma un volumen de 5 ml de orina y se añaden 10 ml del tampón ácido acético/acetato (3.13). Se comprueba el pH final de la muestra y en los casos que sea necesario se corrige con ácido acético diluido hasta alcanzar el pH deseado.

6.2.1.2. Se añaden 75 µl de la enzima (3.5.) a cada muestra y se introducen en el baño de agitación orbital a 70 rpm y 37 °C durante 18 h.

### 6.2.2. Limpieza de las preparaciones

6.2.2.1. La limpieza de las preparaciones obtenidas como resultado de la hidrólisis se efectúa mediante extracción sólido-líquido, empleando los cartuchos de extracción tC-18 (4.10) en un sistema de vacío múltiple con control de presión y flujo (4.13). Para ello se acondiciona el cartucho con 5 ml de acetonitrilo y a continuación con 10 ml de agua. Se adiciona la muestra y posteriormente se limpia el cartucho con 10 ml de la mezcla agua:acetonitrilo (90:10). La muestra se eluye con 5 ml de acetonitrilo, despreciando los primeros 500 µl y se recoge el eluato en un tubo de ensayo de color topacio. En ningún momento se debe dejar secar el cartucho.

6.2.2.2. El extracto se seca con aproximadamente 1 g de tamiz molecular (3.12) durante 5 min y se elimina el disolvente en un concentrador (4.12.1.) a 9 mbar de vacío y a una temperatura de 45 °C. Como alternativa se puede usar un rotavapor (4.12.2.) a una temperatura del baño de 45 °C, llevándolo a sequedad y estando el colector enfriado a una temperatura inferior a 10 °C. El residuo se redissuelve con 0,5 ml de acetonitrilo y se introduce en el baño de ultrasonidos enfriado, durante 2 min para la entera disolución de los metabolitos. El volumen final de acetonitrilo se calcula por pesada.

6.2.2.3. Finalmente, la disolución obtenida se pasa a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro y se introduce en viales (4.3), que se encapsulan, y se procede a su análisis en el sistema de HPLC (4.18).

## 6.3. Preparación de patrones y curva de calibrado

6.3.1. **Disolución de trabajo.** Se prepara la disolución de 1-hidroxipireno y 1-, 2-, 3-, 4-hidroxifenantreno en acetonitrilo de concentración 0,5 µmol/l como se indicó en 3.14.

6.3.2. **Patrones de calibración.** Para cubrir el intervalo de trabajo de 1,1 nmol/l a 102 nmol/l de acetonitrilo para el 1-hidroxipireno y de 1,2 nmol/l a 120 nmol/l acetonitrilo para los hidroxifenantrenos, se preparan 6 patrones correspondientes a 1, 3, 5, 10, 30, 50 nmol/l acetonitrilo añadiendo 1, 3, 5, 10, 30, 50 µl de la disolución de trabajo 6.3.1. hasta un volumen final de 0,5 ml de acetonitrilo, procediendo por pesada.

6.3.3. **Curva de calibración.** La determinación de patrones y blancos se realiza por triplicado. La curva de calibración se traza representando las lecturas en altura absoluta de pico de los diferentes patrones frente a sus respectivas concentraciones expresadas en nmol/l acetonitrilo.

**NOTA:** El 1-hidroxipireno puro en acetonitrilo es sumamente lábil, por lo que, teniendo en cuenta que el tiempo de análisis es largo, la respuesta de la tercera determinación resulta claramente más baja. En este caso sería conveniente efectuar la determinación de los patrones por duplicado.

6.3.4. Las muestras se analizan por triplicado. Para la cuantificación de las muestras se emplea el valor medio de las tres inyecciones.

## 6.4. Determinación

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

Caudal:	1 ml/min
Temperatura:	40 °C
Eluyente:	metanol, agua
Volumen de inyección:	20 µl
Longitudes de onda:	$\lambda_{ex}$ (nm) = 242, $\lambda_{em}$ (nm) = 388
Tiempo de análisis:	30 min
Tiempo de equilibrado:	10 min

El programa de gradiente y los tiempos de retención obtenidos se encuentran recogidos en los cuadros siguientes:

### Programa de gradiente para la determinación de HO-HAPs

Tiempo (min)	Agua (%)	Metanol (%)
0	50	50
10	50	50
20	30	70
30	20	80

### Tiempos de retención

HO-HAPs	Tiempo de retención (min)
3-hidroxifenantreno	21,2
2+9-hidroxifenantreno	21,8
4-hidroxifenantreno	22,7
1-hidroxifenantreno	23,2
1-hidroxipireno	27,8

NOTA: El tiempo de retención del 9-hidroxifenantreno coincide con el del 2-hidroxifenantreno y su respuesta es muy baja. Se cuantifica, por tanto, como 2-hidroxifenantreno.

## 7. CÁLCULOS

**7.1.** Las concentraciones de los HO-HAPs en nmol/l acetonitrilo (a) se determinan por interpolación de las alturas absolutas de los compuestos en sus respectivas rectas de calibración.

**7.2.** Los resultados de los HO-HAPs expresados en nmol/l de orina se obtienen aplicando la siguiente transformación:

$$b = \frac{a \times V}{v}$$

donde:

- b es la concentración de los HO-HAPs en nmol/l orina
- a es la concentración de los HO-HAPs en nmol/l acetonitrilo
- V es el volumen final de la disolución (0,5 ml de acetonitrilo recalculados a partir de la determinación gravimétrica)
- v es el volumen de orina empleado (5 ml)

**7.3.** Si se desea referir la concentración final a la cantidad de creatinina presente en la orina de muestra se aplica la expresión:

$$d = \frac{b}{c}$$

donde:

- d es la concentración de los HO-HAPs referida a la creatinina presente en la muestra y expresada en  $\mu\text{mol HO-HAPs/mol creatinina}$
- b es la concentración de los HO-HAPs en nmol/l orina
- c es la concentración de creatinina en la muestra en mmol/l orina

## 8. PRECISIÓN

**8.1.** El intervalo de trabajo se encuentra comprendido entre 0,1-12 nmol/l de orina para los hidroxiderivados, lo que supondría un intervalo de 0,02-2,30 ng/g creatinina, si se toma como valor de referencia para la creatinina 1,13 g/litro de orina.

**8.2.** El límite de detección para los hidroxifenantrenos es inferior a 0,7 nmol/l acetonitrilo (0,07 nmol/l orina) y para el 1-hidroxipireno es inferior a 0,9 nmol/l acetonitrilo (0,09 nmol/l orina).

**8.3.** La precisión, en términos de coeficiente de variación, en prácticamente todas las experiencias realizadas, resultó ser inferior al 8%. (Véase tabla 2 del Anexo).

**8.4.** La recuperación oscila de unos HO-HAPs a otros y se muestra igualmente en la tabla 2.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 9.1.** 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).
- 9.2.** 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).
- 9.3.** F.J. Jongeneelen. **Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures.** The Science of the Total Environment. 199: 141-149 (1997).
- 9.4.** 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).
- 9.5.** 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).
- 9.6.** J.G.M. VanRooij, M.M. Bodelier-Bade, P.M.J. Hopmans, F.J. Jongeneelen. **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).
- 9.7.** R. Quilan, G. Kowalczyk, K. Gardiner, I.A. 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).
- 9.8.** J.H.M. van Delft, M-J. S.T. Steenwinkel, J.G. van Assten, J. van Es, A. Kraak, R.A. Baan. **Monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a carbon-electrode manufacturing plant.** Ann. Occup. Hyg., 42 (2), 105-114 (1998).
- 9.9.** J. Jacob, G. Grimmer, G. Dettbarn. **Profile of urinary phenanthrene metabolites in smokers and non-smokers.** Biomarkers, 4 (5), 319-327 (1999).
- 9.10.** J. Gündel, K.H. Schaller, J. Angerer. **Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenantrene, 3-hydroxybenzo(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene.** Int. Arch. Occup. Environ. Health, 73, 270-274 (2000).
- 9.11.** G. Grimmer, G. Dettbarn, J. Jacob. **Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenantrene and pyrene metabolites (phenols and dihydrodiols).** Int. Arch. Occup. Environ. Health, 65, 189-199 (1993).

**9.12.** M. Bouchard, C. Viau. **Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments.** *Biomarkers*, 4 (3), 159-178 (1999).

**9.13.** J. Angerer, C. Mannschreck, J. Gündel. **Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 69, 323-331 (1997).

**9.14.** T.G. Rosano, R.T. Ambrose, A.H.B. Wu, T.A. Swift, P. Yadegari. **Candidate reference method for determining creatinine in serum: method development and interlaboratory validation.** *Clin. Chem.* 36/11, 1951-1955 (1990).

**9.15.** Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, sobre

**Clasificación, Etiquetado y Envasado de Sustancias y Mezclas**, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006.

**9.16.** ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio. Especificaciones.**

**9.17.** ISO 8655, "Partes 1 a 4". **Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo.**

**9.18.** ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes.** Propiedades del vidrio borosilicatado.

**9.19.** J.C. Miller, J.N. Miller, **Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley, Iberoamericana**, Wilmington, 1993, pp 100-103.

**9.20.** Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial.** MTA/PV – IV(2)/98.

## ANEXO

## Validación del método

En este anexo se recogen los resultados obtenidos durante el proceso de validación del método siguiendo, en la medida de lo posible, los criterios recogidos en el "Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial" (9.20).

Los límites de detección para los HO-HAPs calculados a partir de la ecuación de la recta de calibración según el criterio de Miller y Miller (o.o. +  $3s_{y/x}$ ) (9.19) en los intervalos lineales indicados se muestran en la tabla 1.

Para el cálculo de la precisión y la exactitud (recuperación) del método se ha llevado a cabo una prueba intralaboratorio con muestras adicionadas. Se ha utilizado el proceso de tratamiento de muestra y análisis completo excepto el paso de la hidrólisis enzimática (para evitar un aumento en la concentración de los hidroxiderivados de los HAPs producidos por la hidrólisis de la orina base). Se utiliza un "pool" de orinas de individuos sin exposición laboral a HO-HAPs. A partir del pool de orinas y la disolución 3.14. se preparan 8 réplicas de 5 ml de orina, de concentración 1 nmol/l orina y otras 8 réplicas de concentración 5 nmol/l orina. La tabla 2 muestra los valores obtenidos en el análisis de las muestras mencionadas y los valores de precisión y recuperación obtenidos.

El ensayo de estabilidad y conservación se ha realizado con una muestra real de orina de un voluntario fumador. Una vez recogida la muestra se somete a media hora de agitación mecánica y se reparte en diez frascos de 50 ml que se distribuyen, protegidos de la luz, de la siguiente manera: uno para el análisis inmediato, tres se conservan a temperatura ambiente (en torno a los 20 °C), tres a 4 °C y otros tres se congelan a -20 °C. De cada frasco de orina se toman seis alícuotas de 5 ml cada una. Se analizan siguiendo las indicaciones del método.

La tabla 3 recoge las variaciones de concentración experimentadas por las diversas alícuotas en las condiciones de almacenamiento ensayadas. Cada valor indicado en las columnas m corresponde a la media aritmética (m) de los resultados de 6 alícuotas diferentes de orina. La columna % dif contiene los valores correspondientes a la diferencia en porcentaje entre la concentración media obtenida en las muestras analizadas al cabo de un tiempo t y las analizadas de forma inmediata tras la toma de muestra.

Tabla 1

## Límites detección

Compuesto	Intervalo recta de calibración nmol/l acetonitrilo)	Límite de detección (nmol/l acetonitrilo)	Límite de detección (nmol/l orina)
<b>3-hidroxifenantreno</b>	1,17-18,66	0,54	<b>0,054</b>
<b>2+9-hidroxifenantreno</b>	1,17-18,68	0,54	<b>0,054</b>
<b>4-hidroxifenantreno</b>	1,17-18,64	0,66	<b>0,066</b>
<b>1-hidroxifenantreno</b>	1,18-18,80	0,70	<b>0,070</b>
<b>1-hidroxipireno</b>	1,10-24,66	0,88	<b>0,088</b>

Tabla 2

## Prueba interlaboratorio de exactitud y precisión ("Concentración baja")

"Concentración baja"		Resultados obtenidos			
	Concentración esperada nmol/l orina	Concentración medida nmol/l orina	Nº réplicas	CV %	REC %
3-hidroxifenantreno	1	0,960	8	7,4	96,0
2+9-hidroxifenantreno	1	0,993	8	8,0	99,3
4-hidroxifenantreno	1	0,873	8	7,1	87,3
1-hidroxifenantreno	1	0,892	8	8,2	89,2
1-hidroxipireno	1	0,860	8	5,9	86,0

**CV** es coeficiente de variación

**REC** es la recuperación de la adición

## Prueba intralaboratorio de exactitud y precisión ("Concentración alta")

"Concentración alta"		Resultados obtenidos			
	Concentración esperada nmol/l orina	Concentración medida nmol/l orina	Nº réplicas	CV %	REC %
3-hidroxifenantreno	5	4,730	8	2,7	94,6
2+9-hidroxifenantreno	5	4,825	8	3,6	96,5
4-hidroxifenantreno	5	4,500	8	3,6	90,0
1-hidroxifenantreno	5	4,455	8	3,4	89,1
1-hidroxipireno	5	4,195	8	7,2	83,9

**CV** es coeficiente de variación

**REC** es la recuperación de la adición

Tabla 3

## Estudio de estabilidad y conservación

METABOLITOS		3- hidroxifenantreno		2+9- hidroxifenantreno		4- hidroxifenantreno		1- hidroxifenantreno		1- hidroxipireno	
		m nmol l <sup>-1</sup>	% dif	m nmol l <sup>-1</sup>	% dif						
Inmediato	T <sup>a</sup> amb	0,143	-	0,241	-	0,070	-	0,203	-	0,055	-
	T <sup>a</sup> amb	0,149	4,2	0,240	- 0,5	0,071	1,7	0,199	- 1,8	0,058	4,3
48 horas	4 °C	0,137	- 4,2	0,241	0,0	0,069	- 0,9	0,198	- 2,4	0,052	- 5,4
	- 20 °C	0,140	2,5	0,241	0,0	0,070	0,0	0,206	1,5	0,055	0,0
7 días	T <sup>a</sup> amb	0,173	20,5	0,230	- 4,7	0,073	5,2	0,203	0,3	0,062	12,0
	4 °C	0,158	10,0	0,245	1,5	0,073	4,3	0,203	0,0	0,051	- 7,6
	- 20 °C	0,154	7,1	0,244	1,2	0,071	2,6	0,201	- 0,9	0,054	- 2,2
14 días	T <sup>a</sup> amb	0,111	- 22,6	0,188	- 21,9	0,041	- 41,4	0,164	- 18,9	0,061	10,9
	4 °C	0,147	2,5	0,242	0,5	0,065	- 6,9	0,223	10,1	0,052	- 6,5
	- 20 °C	0,131	- 8,8	0,211	- 12,4	0,058	- 17,2	0,203	0,0	0,067	21,7

**% Dif** es la diferencia en porcentaje entre la concentración media obtenida en las muestras analizadas al cabo de t días y las analizadas de forma inmediata tras la toma de muestra



MINISTERIO  
DE TRABAJO  
E INMIGRACIÓN



INSTITUTO NACIONAL  
DE SEGURIDAD E HIGIENE  
EN EL TRABAJO