

# HIPPURIC ACID, METHYLHIPPURIC ACIDS, MANDELIC ACID AND PHENYLGLYOXYLIC ACID IN URINE – HPLC

## ÁCIDOS HIPÚRICO, METILHIPÚRICO, MANDÉLICO E FENILGLIOXÍLICO EM URINA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de ácidos hipúrico, metilhipúrico, mandélico e fenilglioixílico em urina por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
43000	Kit reagente para análise dos Ácidos Hipúrico, Metilhipúrico, Mandélico e Fenilglioixílico em Urina (100 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise dos Ácidos Hipúrico, Metilhipúrico, Mandélico e Fenilglioixílico em Urina por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

### SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análise dos principais metabólitos dos solventes tolueno, xileno e estireno, sendo útil na avaliação do grau de exposição ocupacional a estes solventes (medicina ocupacional). A análise é aplicada em amostras de urina, empregando um sistema isocrático de HPLC com detector UV.

### MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

### PRINCÍPIO

Durante o preparo da amostra, a urina é estabilizada e as partículas e os possíveis interferentes presentes na amostra são eliminados por uma etapa de centrifugação. A amostra pode ser analisada com qualquer sistema de HPLC isocrático com detecção UV. Após a injeção no sistema de HPLC, a detecção UV permite a leitura de absorbância dos analitos em comprimento de onda selecionado (207 nm). A inclusão do padrão interno minimiza variações analíticas e garante alta precisão e confiabilidade dos resultados.

### REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Solução aquosa com tetrahydrofurano, propanolol e tetrametilamônia	1 x 1000 mL
Padrão de Calibração em Urina (Urine Calibration Standard)	Urina humana liofilizada com ácidos hipúrico, metilhipúrico, mandélico e fenilglioixílico	5 x 0,5 mL (liof.)
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de heptadecanóico	1 x 100 mL
Frascos de reação (Reaction vials)	-	100 unidades

### INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. As tabelas abaixo mostram as temperaturas de armazenagem para os reagentes do kit:

Artigo	Produto	Temperatura
43001	Fase Móvel	+18 a +30°C
43003	Padrão de Calibração em Urina (liofilizado)	Abaixo de -18 °C
43004	Padrão Interno	+2 a +8 °C

### CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

### GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

### DESCARTE

A fase móvel e os resíduos das amostras preparadas contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, e de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**Fase Móvel:** pronto para uso.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

### Padrão de Calibração de Medicina Ocupacional em Urina (liofilizado):

O calibrador (artigo 43003) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir, pipetar exatamente 0,5 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evitar a exposição direta à luz. O calibrador reconstituído é estável por 4 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 3 meses), preparar alíquotas e conservar a -18°C. Evitar recongelar o calibrador. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

## MATERIAIS REQUERIDOS E DISPONÍVEIS, NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 43100).  
Padrão de Calibração em Urina (liofilizado) (Chromsystems art. 43003).

Controle de Medicina Ocupacional em Urina Bi-Nível (I+II) (Chromsystems art. 00141).

Água tipo I ou grau HPLC.

Centrífuga para microtubos.

Metanol grau HPLC.

Material geral de laboratório.

## AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de urina, coletadas ao final do expediente de trabalho. As amostras devem ser transportadas em refrigeração.

**Estabilidade da amostra:** as amostras coletadas desta forma são estáveis por até 7 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até 3 meses), conservar a - 18 °C (evitar recongelamento).

**Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):** as amostras preparadas são estáveis por até 3 dias em temperatura ambiente e por até 6 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C, e protegidas da luz. Para períodos maiores de armazenamento (até 14 dias), conservar a - 18 °C.

## PROCEDIMENTOS DO TESTE

### Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	20µL
Tempo de corrida:	20 min.
Detector UV:	Comprimento de onda de 207 nm
Fluxo:	1.0 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)
Limpeza da agulha do injetor:	Água grau HPLC

### Procedimento de preparo de amostras:

Utilizar os tubos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente.

1. Transferir 1000µl de Padrão Interno para um tubo de reação devidamente identificado.
2. Adicionar 10µl de urina (padrões, controles e amostras) e agitar brevemente (vortex), rinsar a ponteira do pipetador várias vezes.
3. Centrifugar por 5 min a 9000 x g.
4. Injetar 20µl do sobrenadante no sistema de HPLC.

Controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Tempo de retenção esperado:

Análito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Ác. Mandélico	3.7
Ác. Hipúrico	6.2
Ác. Fenilgloxílico	7.0
Ác. o-Metilhipúrico	8.7
Padrão Interno	13.1
Ác. p-Metilhipúrico	16.0
Ác. m-Metilhipúrico	17.0

## CÁLCULOS

$$C_{\text{Análito}} [\text{mg/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times I_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times I_{\text{Amostra}}} \times *C_{\text{Calibrador}}$$

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A<sub>amostra</sub>

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = Calibrador

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS<sub>Amostra</sub>

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS<sub>Calibrador</sub>

Concentração C do analito A no calibrador = \*C<sub>Calibrador</sub>

\* A concentração dos analitos individuais depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao padrão de calibração e às amostras, a concentração do padrão interno pode ser considerada como "1" para fins de cálculo.

Fatores de conversão:

Análito	mg/L para µmol/L	µmol/L para mg/L
Ác. Hipúrico	5.58	0.179
Ác. Metilhipúrico	5.18	0.193
Ác. Mandélico	6.57	0.152
Ác. Fenilgloxílico	6.66	0.150

## CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
43003	Padrão de Calibração em urina (liofilizado)	5 x 0,5ml
0141	Controle de Medicina Ocupacional em Urina Bi-Nível (I+II)	2 x 5 x 0,5ml

## DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Faixa de Medição:

Análito	Limite de quantificação*	Limite máximo de linearidade
Ác. Hipúrico	15 mg/L	18000 mg/L
Ác. o-Metilhipúrico	15 mg/L	7000 mg/L
Ác. p-Metilhipúrico	15 mg/L	7000 mg/L
Ác. m-Metilhipúrico	15 mg/L	7000 mg/L
Ác. Mandélico	15 mg/L	4000 mg/L
Ác. Fenilgloxílico	15 mg/L	1700 mg/L

\*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Recuperação:

Análito	Recuperação [%]
Ác. Hipúrico	94%
Ác. o-Metilhipúrico	107%
Ác. p-Metilhipúrico	103%
Ác. m-Metilhipúrico	103%
Ác. Mandélico	102%
Ác. Fenilgloxílico	106%
Ác. Hipúrico	94%

Precisão:

A determinação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras, analisadas em diferentes concentrações.

Precisão intra-ensaio n = 8	Coeficiente de variação (%) / Concentração (mg/l)		
Ác. Mandélico	1.0 (242)	0.7 (647)	0.8 (425)
Ác. Hipúrico	2,4/1000	0,8/1450	1,3 / 690
Ác. o-Metilhipúrico	2,2 / 480	0,7 / 640	1,5 / 280
Ác. p-Metilhipúrico	2,0 / 520	0,7 / 740	1,4 / 290
Ác. m-Metilhipúrico	2,1 / 490	0,7 / 630	1,9 / 290
Ác. Mandélico	2,5 / 430	1,4 / 380	1,4 / 250

Precisão inter-ensaio n = 100	Coefficiente de variação (%) / Concentração (mg/l)
Ác. Hipúrico	3,9 / 1450
Ác. o-Metilhipúrico	4,5 / 640
Ác. p-Metilhipúrico	5,1 / 650
Ác. m-Metilhipúrico	5,0 / 650
Ác. Mandélico	6,0 / 360
Ác. Fenilglioxílico	7,0 / 150

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ

Cep: 24020-112

CNPJ: 02.220.795/0001-79

MS – nº 10350840245

SAC: [sac@biosys.com.br](mailto:sac@biosys.com.br) – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)

#### VALORES DE REFERÊNCIA

Analito	Índice Biológico de Exposição (IBE)
Ác. Hipúrico	1500 mg/L urina
Ác. Metilhipúrico (Σ)	2000 mg/L urina
Ác. Mandélico	400 mg/L urina
Ác. Fenilglioxílico	100 mg/L urina

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência baseados na legislação e para adaptar o método às características da população analisada.

#### LITERATURA

1. Flanagan R. J., Ruprah M., Meredith T. J., Ramsey J. D. An introduction to the clinical toxicology of volatile substances. *Drug Safety*, 5, 359-83 (1990).
2. Marczynski B., Peel M., Baur X. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure – a working hypothesis. *Medical Hypothesis*, 54, 619-23 (2000).
3. Langman J. L. Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. *Pathology*, 26, 301-9 (1994).
4. Ikeda M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. *Toxicology Letters*, 77, 85-91 (1995).
5. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg). MAK- und BAT-Werte Liste 2013: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 49, Wiley-VCH Verlag (2013).

#### Símbolos Usados

