

## o-Cresol, p-Cresol, Phenol in Urine - HPLC

### o-Cresol, p-Cresol, Fenol em Urina - HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de o-Cresol, p-cresol, Fenol em Urina por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
41000	Kit Reagente para Análise o-Cresol, p-cresol, Fenol em Urina por HPLC (100 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de o-Cresol, p-Cresol, Fenol em Urina por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

#### SUMÁRIO

O kit de reagentes da Chromsystems o-Cresol, p-Cresol, Fenol na urina é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* a ser usado em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa de o-cresol, p-cresol e fenol em amostras de urina de pacientes por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit é um teste para que os pacientes monitorem sua carga de fenol e tolueno.

#### MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência.

#### PRINCÍPIO

Este kit de reagentes da Chromsystems permite a determinação cromatográfica confiável e rápida de orto- e para-cresol, bem como fenol em uma corrida de HPLC isocrática. A preparação da amostra é rápida e simples e requer apenas duas etapas: Na primeira etapa (hidrólise ácida), os fenóis presentes na urina na forma de conjugados (principalmente sulfatos e glicuronídeos) são transformados de forma eficiente na forma livre. Os problemas típicos que ocorrem na decomposição enzimática (tempo de reação longo, liberação incompleta) são evitados. Na segunda etapa, as amostras são estabilizadas pela adição de um tampão especial. Os analitos são medidos usando separação cromatográfica otimizada com detecção de fluorescência altamente sensível, de modo que a maioria das interferências potenciais sejam excluídas. A inclusão de um padrão interno feito sob medida garante alta precisão e confiabilidade na quantificação dos analitos.

#### REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Acetonitrila - 10 a 25%	1000 mL
Reagente de Hidrólise (Hydrolysis Reagent)	Ácido Sulfúrico - 50 a 100 %	1 x 15 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Acetonitrila 25 a 50% contendo derivado de fenol < 0,1%	1 x 5 mL
Tampão de Estabilização (Stabilisation Buffer)	Hidróxido de sódio 10 a 25%	1 x 60 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.

Após abertura dos frascos os reagentes são estáveis por até 12 meses, mas não deve exceder a data de validade.

Artigo	Produto	Temperatura
41001	Fase móvel	+18 a +30°C
41055	Reagente de Hidrólise	+18 a +30°C
41004	Padrão Interno	+2 a +8 °C
41006	Tampão de Estabilização	+18 a +30°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, o padrão interno e os resíduos das amostras preparadas contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio.

O Reagente de Hidrólise contém um ácido forte, o Tampão de Estabilização um álcali forte. Neutralize as soluções e descarte em um recipiente para soluções de sal.

As soluções mencionadas não devem ser eliminadas juntamente com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Descarte em conformidade com requisitos nacionais e locais. Seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, bem como outras práticas de biossegurança equivalentes em vigor. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e apenas o acesso permitido a partes autorizadas.

#### PREPARO DOS REAGENTES

**Fase Móvel:** pronto para uso.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

**Reagente de Hidrólise:** pronto para uso.

**Tampão de Estabilização:** pronto para uso.

#### MATERIAIS REQUERIDOS E DISPONÍVEIS, NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 41100). Controle em urina contendo o-Cresol, p-Cresol, fenol bi-nível (I+II) (Chromsystems art. 0138).

Controle em urina contendo o-Cresol, p-Cresol, fenol nível I (Chromsystems art. 0139).  
 Controle em urina contendo o-Cresol, p-Cresol, fenol nível II (Chromsystems art. 0140).  
 Calibrador em urina liofilizado contendo o-Cresol, p-Cresol, fenol (Chromsystems art. 41003).  
 Padrão Interno (Chromsystems art 41004)  
 Água tipo I ou grau HPLC.  
 Metanol grau HPLC.  
 Acetonitrila grau HPLC.  
 Material geral de laboratório.

#### AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de urina.  
 Tubos de urina com hexametilenotetramina (urotropina) como estabilizador não são adequados para a análise de fenóis usando este método. As intensidades de sinal dos analitos e do padrão interno são prejudicadas; no pior caso, o sinal pode ser perdido completamente.

**Estabilidade da amostra:** A urina é usada para análise. A vida de armazenamento é de até 3 dias à temperatura ambiente e de até 4 semanas à +2 a +8°C. Para armazenamento mais longo, congelar abaixo de -18°C (até 2 meses).

**Estabilidade das amostras preparadas (eluatós):** Bem seladas em frascos de vidro, as amostras preparadas podem ser mantidas por 1 semana em temperatura ambiente ou por 2 semanas entre +2 e +8°C ou abaixo de -18 °C. Se as amostras preparadas foram armazenadas à baixa temperatura, certifique-se de resolver os analitos potencialmente precipitados por meio de aquecimento e homogeneização antes da injeção!

#### PROCEDIMENTOS DO TESTE

##### Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 10µL, tempo de corrida 14 min.  
 Detector por fluorescência: Comprimento de onda de EX 270 nm, EM 300 nm  
 Fluxo: 1,3 mL/min (1,1-1,5 mL/min)  
 Temperatura da coluna: Ambiente (aprox. 30 °C)  
 Solução de lavagem da agulha: Água/acetonitrila = 80/20

##### Procedimento de preparo de amostras:

1. Pipetar 100 µL de urina (amostra, controles e calibrador), adicionar 150 µL de Reagente de Hidrólise e 50 µL de Padrão Interno, em um frasco de hidrólise \*, selar bem e misturar brevemente.
2. Incubar 30 minutos a 95°C
3. Deixe esfriar até a temperatura ambiente (aprox. 5 min à temperatura ambiente).
4. Adicionar 600 µL de tampão de estabilização, misturar rapidamente em vórtex.
5. Injetar 10 µL da mistura no sistema de HPLC

\* Os frascos de hidrólise podem ser carregados diretamente em vários amostradores automáticos de HPLC.

##### Importante:

Algumas das amostras preparadas podem conter partículas após a hidrólise. Nestes casos, centrifugue a amostra e injete o sobrenadante.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Fenol	5,5
p-Cresol	10,1
o-Cresol	11,3
Padrão Interno	12,9

Para garantir que nem a calibração nem as condições de HPLC (tempos de retenção, etc) mudaram no decorrer de uma execução analítica, o calibrador preparado deve ser injetado durante a execução e novamente no final. Para avaliação, selecione "método de padrão interno".

#### CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = Aamostra  
 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 = ISAmostra  
 Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = ISCalibrador  
 Concentração C do analito A no calibrador = \*CCalibrador

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

Fatores de conversão:

Analito	mg/L para µmol/L	µmol/L para mg/L
Fenol	x 10,63	x 0,0941
o-cresol, p-cresol	x 9,247	x 0,1081

#### DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Para verificar a linearidade e validar o método, as amostras de urina foram fortificadas com quantidades definidas de fenilglucuronida, orto- e para-cresilglucuronida e processadas repetidamente.

#### Linearidade / limite de quantificação:

O método é linear desde o limite designado de quantificação até pelo menos o limite superior declarado

Analito	Limite de quantificação (mg/L)	Limite linearidade (até pelo menos mg/L)
Fenol	0,04	50
p-cresol	0,04	200
o-cresol	0,04	20

\* O limite de quantificação depende do detector empregado!

\*\* Em altas concentrações, um volume de injeção menor (5 µL) pode ser escolhido para evitar a sobrecarga do detector.

#### Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de amostras de urina enriquecidas e soluções padrão diluídas:

Analito	Taxas de recuperação (%)
Fenol	97
p-Cresol	98
o-Cresol	98
Padrão Interno	101

#### Precisão intra-ensaios:

A precisão intra-ensaios foi determinada em três concentrações diferentes, por meio de múltiplos processamentos (n = 10) da mesma amostra:

Analito	Coeficiente de variação (%), n = 10 (Conc. mg/l)		
	Fenol	1,3 (4,29)	0,5 (8,05)
p-Cresol	1,3 (5,22)	0,6 (9,83)	1,3 (16,0)
o-Cresol	2,2 (0,56)	0,5 (1,63)	1,1 (3,88)

\*n = 10

#### Precisão inter-ensaios:

A determinação da precisão inter-ensaios foi determinada por múltiplos processamentos (10x) e determinação das concentrações dos analitos em um pool de urina, em 10 séries de testes diferentes (duas concentrações diferentes):

Analito	Coeficiente de variação (%), n = 100 (Conc. mg/l)	
	Fenol	2,6 (4,17)
p-Cresol	2,5 (5,10)	2,2 (15,6)
o-Cresol	3,8 (0,54)	3,0 (3,75)

#### VALORES DE REFERÊNCIA

	Limites ocupacionais na urina
Fenol total <sup>(1)</sup>	200 mg/L (BGV)
Cresol total <sup>(1)</sup>	200 mg/L (BGV)
O_cresol (como metabolito do tolueno)	1,5 mg/L (BTV)
O_Cresol <sup>(2)</sup>	0,8 mg/L

	Intervalo de referência na urina (mg/g de creatinina)
Fenol total <sup>(3)</sup>	4,5-20,7
p-Cresol <sup>(3)</sup>	5,5-65
o-Cresol)	n.d.

BGV = Valor Biológico da Diretriz  
BTV = Valor de Tolerância Biológica

Fonte:

1. MAK- und BAT-Werte-Liste 2009, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (ed.), Wiley-VCH, Weinheim (2009).
2. Tolerable exposure limit for toluene subject to: Landesgesetzblatt für Wien, 16. Stück (2002).
3. CDC, NIOSH, Method 8305 (1994).

Nenhum BTV foi definido para o fenol devido às suas propriedades cancerígenas.

#### LITERATURA

1. Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg). Lehrbuch der Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (1997).
2. Landesgesetzblatt für Wien, 16. Stück (2002).
3. Dou I, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, De Smet R, Vanholder R, Sampol J, Berland Y. (2002) P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. *Kidney Int* 62(6): 1999-2009.
4. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg). MAK- und BAT-Werte-Liste 2009: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 49. Wiley-VCH Verlag (2009).
5. Truchon G, Tardiff R, Brodeur J (1999) O-cresol: a good indicator of exposure to low levels of toluene. *Appl Occup Environ Hyg*, 14(10): 677-81.
6. Pierce CH, Chen Y, Dills RL, Kalman DA, Morgan MS (2002) Toluene metabolites as biological indicators of exposure. *Toxicol Lett* 129(1-2): 65-76.
7. Bieniek G (1997), Urinary excretion of phenols as an indicator of occupational exposure in the coke-plant industry. *Int Arch Occup Environ Health*. 70(5): 334-40.

8. Stouten H. (1998) DECOS and SCG Basis for an occupational standard. Cresols (o-, m-, p). *Arbete och hälsa* 27:1-48.
9. International Programme on chemical safety, Environmental Health Criteria 161, Phenol, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm> (1994).

#### Símbolos Usados



**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: 10350840411**

**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)**