

ACIDO FENILGLIOSSILICO / ACIDO MANDELICO / ACIDO IPPURICO /
ACIDI o-m-p-METILIPPURICI URINARI in UV – Codice Z06510

BIOCHIMICA

La determinazione dell'**Acido Fenilgliossilico (PGA)** e dell'**Acido Mandelico (MDA)** viene impiegata per il monitoraggio biologico dei soggetti esposti a **Stirene**.

Infatti lo **Stirene** viene trasformato dall'organismo dapprima in **Stirene-ossido**, quindi in **Feniletilenglicole** e successivamente in **Acido Fenilgliossilico** e **Acido Mandelico** (fig.1) i quali vengono eliminati immodificati.

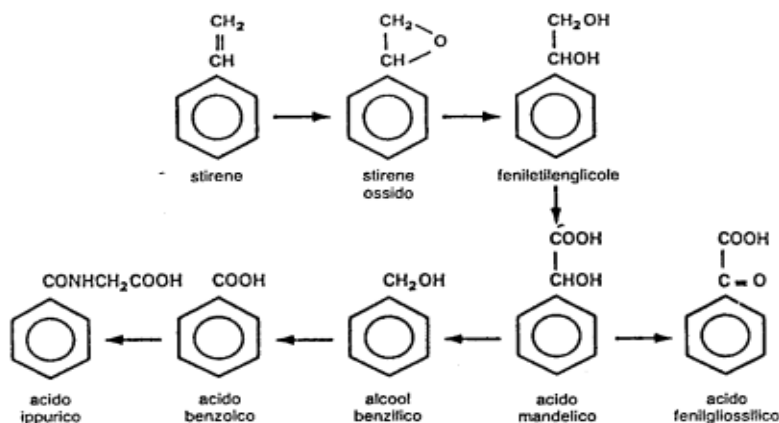


Fig. 1 : Biotrasformazione dello stirene in vivo

La determinazione dell'**Acido Ippurico (HPA)** urinario viene impiegata per il monitoraggio biologico dei soggetti esposti a **Toluene**.

Infatti il **Toluene** viene trasformato dall'organismo prevalentemente in **Acido Benzoico** il quale, dopo coniugazione con **Glicina**, viene eliminato con le urine come **Acido Ippurico**. (fig.2).

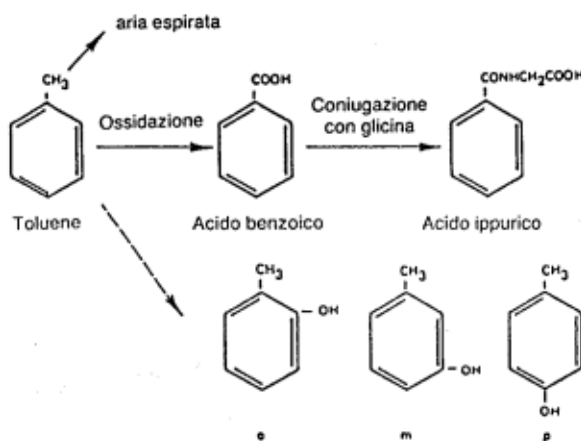


Fig. 2 : Biotrasformazione del toluene in vivo

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax +39 071 7496579

CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

La determinazione degli **Acidi o-m-p-Metilippurici** (**m-MHPA**, **o-MHPA** e **p-MHPA**) viene impiegata per il monitoraggio biologico dei soggetti esposti a miscele di **o-m-p-Xilene**. Infatti lo **Xilene**, presente nei formulati commerciali come miscela dei tre isomeri o-m-p, viene trasformato dall'organismo in miscela di **Acidi o-m-p-Metil-Benzoici** i quali, dopo coniugazione con la **Glicina**, vengono eliminati come miscela di **Acidi o-m-p-Metil-Ippurici** con le urine. (fig. 3)

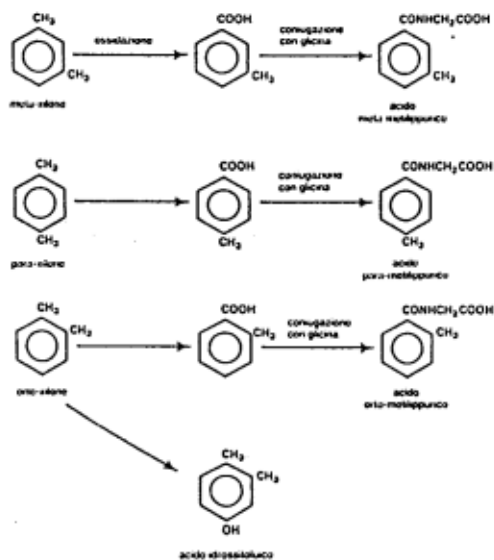


Fig. 3 : Biotrasformazione dello Xilene in vivo

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L'Acido **Fenilgliossilico (PGA)**, l'Acido **Mandelico (MDA)**, l'Acido **Ippurico (HPA)** e gli Acidi **o-m-p-Metilippurici (m-MHPA, o-MHPA e p-MHPA)** vengono analizzati previa diluizione con una soluzione diluente e successiva aggiunta di una soluzione stabilizzante. La soluzione così ottenuta viene iniettata direttamente in HPLC.

Recupero del Metodo :

100%

Sensibilità del Metodo :

0,2 µg/ml

CV% :

Ac. Fenilgliossilico	2,60%
Ac. Mandelico	2,07%
Ac. Ippurico	3,14%
Ac. o-m-p- Metilippurici totali	3,02%

Valori accettabili in soggetti non esposti :

Ac. Fenilgliossilico:	< 5 mg/l
Ac. Mandelico:	< 5 mg/l
Ac. Ippurico:	< 1500 mg/l
Ac. o-m-p- Metilippurici totali:	< 1 mg/l

Valori accettabili in urine di fine turno :

Ac. Fenilgliossilico:	< 264 mg/l
Ac. Mandelico:	< 880 mg/l
Ac. Ippurico:	< 1600 mg/l
Ac. o-m-p-Metilippurici totali:	< 1500 mg/l

Range dinamico del metodo :

Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2002;24:3 Suppl
0,2 – 5.000 µg/ml

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente (≤ 20 °C). Il Calibratore è stabile 36 mesi a 2–8 °C.

Reagente A - Soluzione diluente, **1 x 200 ml**

Reagente B - Soluzione Stabilizzante, **1 x 50 ml**

Reagente C - Sol. Test, **1 x 10 ml**

Stoccare a 2-8 °C

Reagente D - Sol. Test MDA e PGA, **1 x 10 ml**

Stoccare a 2-8 °C

Reagente E - Sol. Test HPA, m-MHPA, o-MHPA e p-MHPA, **1 x 10 ml** **Stoccare a 2-8 °C**

Reagente F - Calibratore urinario liofilo, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente M - Fase mobile, **2 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl.
Detector spettrofotometrico UV/VIS **λ=207 nm**
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità per il prelievo urinario:

All'inizio del turno lavorativo settimanale e alla fine del medesimo, è consigliato raccogliere 10 ml di urine in una provetta e inviarle al Laboratorio.

Fase preanalitica :

Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti.
Stabile 4 settimane a 2- 8 °C o 6 mesi a – 20 °C.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test.

In una provetta pipettare :

- 990 µl di Acqua grado HPLC
- 10 µl di **Reagente C – Sol. Test**

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia tempi di ritenzione simili a quelli riportati in fig. 4. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. ***Importante*** : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei campioni

In provette da centrifuga idonee dispensare in sequenza.

	Bianco	Calibratore	Campione
Reagente A – Sol. diluente	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml
Reagente B – Sol. stabilizzante	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Acqua di grado HPLC	0,02 ml		
Reagente F – Calibratore liofilo		0,02 ml	
Campione			0,02 ml

Al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 4.000 rpm per 5 minuti.

N.B.: il campione così preparato è stabile 5 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl del sovranatante nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma

Acido FENILGLIOSSILICO / Acido MANDELICO / Acido IPPURICO /
Acidi o-m-p-METILIPPURICI urinari in UV – Avvertenze

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST

Acido Fenilgliossilico	1000 mg/l
Acido Mandelico	1000 mg/l
Acido Ippurico	1000 mg/l
Acido o-Metilippurico	1000 mg/l
Acido m-Metilippurico	500 mg/l
Acido p-Metilippurico	500 mg/l

REAGENTE D : SOLUZIONE TEST Ac. Fenilgliossilico / Ac. Mandelico

Acido Fenilgliossilico	1000 mg/l
Acido Mandelico	1000 mg/l

REAGENTE E : SOLUZIONE TEST Ac Ippurico, Acidi o-m-p-Metilippurici

Acido Ippurico	1000 mg/l
Acido o-Metilippurico	1000 mg/l
Acido m-Metilippurico	500 mg/l
Acido p-Metilippurico	500 mg/l

REAGENTE F : CALBRATORE URINARIO LIOFILO - Lotto n° 006

Acido Fenilgliossilico	219,8 mg/l
Acido Mandelico	894,6 mg/l
Acido Ippurico	1481,6 mg/l
Acido o-Metil Ippurico	479,4 mg/l
Acido p-Metil Ippurico	485,6 mg/l
Acido m-Metil Ippurico	490,8 mg/l
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilati sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 12 ore a T Ambiente, 7 giorni se conservati a 2 - 8° C e 1 mese a -20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 5 ml	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	207 nm
GAIN	0,01 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 μ, è tassativo l'uso del Metasaver Precolumn Filter 0.5 um (1 x 10 pz.) cod. ZA6005.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <i>nuova</i> Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 μ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H₂O per HPLC, al flusso di 1,2 ml/minuto. <u>Non riciclare i liquidi di lavaggio.</u> Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. <u>E' possibile effettuare analisi a ricircolo di fase, purchè si abbia l'accortezza di filtrare la stessa Fase Mobile con filtro da 0,22 μ prima di ogni seduta analitica.</u> Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di H₂O e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H₂O prima di condizionarla con la Fase Mobile.

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	8
--------------	---

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z06016	Calibratore multiparametrico per 6 parametri urinari	4 x 5 ml
Z38017	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici urinari-Livello 1	5 x 10 ml
Z38018	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici urinari-Livello 2	5 x 10 ml
Z38019	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici urinari-Livelli 1,2	2 x 5 x 10 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 µm)	1 PZ
ZA6005	Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



Ac. FENILGLIOSSILICO, Ac. MANDELICO, Ac. IPPURICO e Acidi o-m-p-MetilIPPURICI urinari in UV
(Cromatogramma di riferimento)

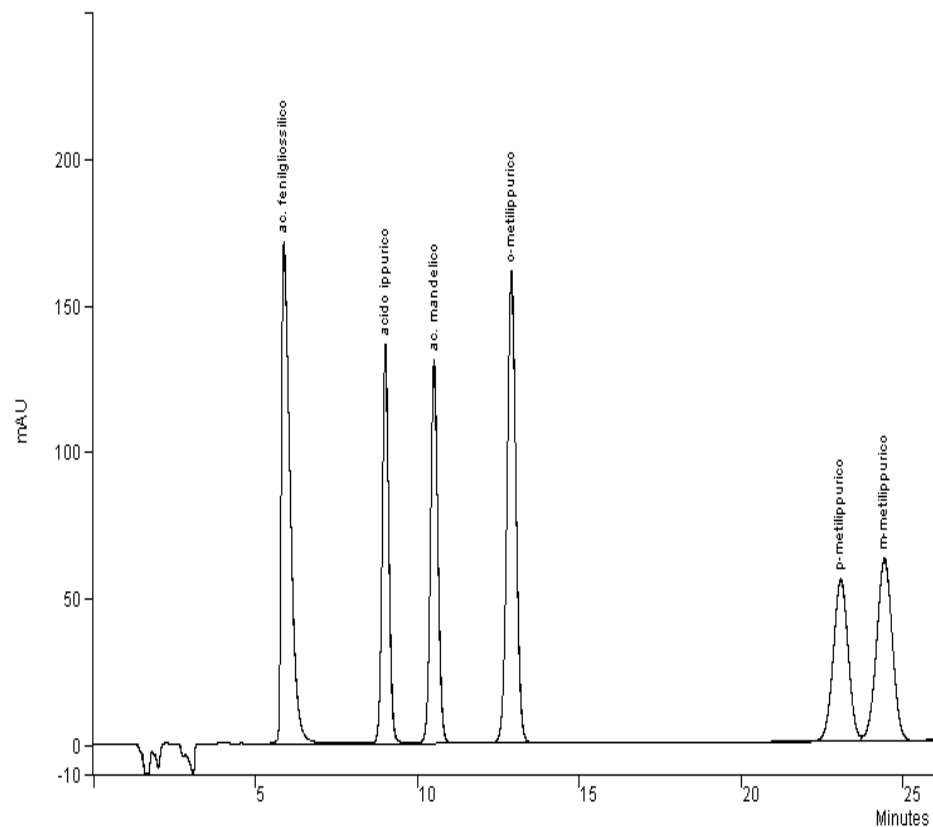


Fig. 4 :

Soluzione Test			
R.T.	5.72	Ac. Fenilgliossilico	1000 mg/l
R.T.	9.04	Ac. Ippurico	1000 mg/l
R.T.	10.48	Ac. Mandelico	1000 mg/l
R.T.	12.95	Ac. o-Metilippurico	1000 mg/l
R.T.	23.41	Ac. p-Metilippurico	500 mg/l
R.T.	24.62	Ac. m-Metilippurico	500 mg/l

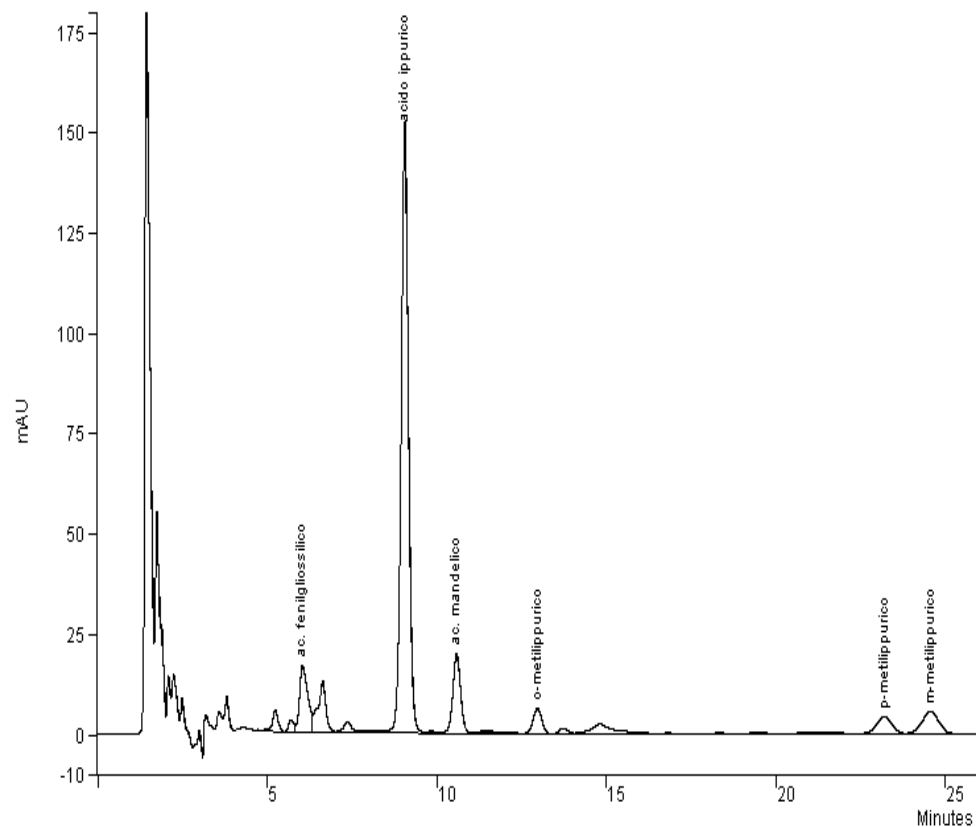


Fig. 5 :

Calibratore liofilo urinario			
R.T.	5.75	Ac. Fenilgliossilico	118 mg/l
R.T.	9.03	Ac. Ippurico	1360 mg/l
R.T.	10.52	Ac. Mandelico	199 mg/l
R.T.	12.94	Ac. o-Metilippurico	55 mg/l
R.T.	23.18	Ac. p-Metilippurico	56 mg/l
R.T.	24.55	Ac. m-Metilippurico	56 mg/l

Ac. FENILGLIOSSILICO, Ac. MANDELICO, Ac. IPPURICO e Acidi o-m-p-MetilIPPURICI urinari in UV
(Cromatogramma di riferimento)

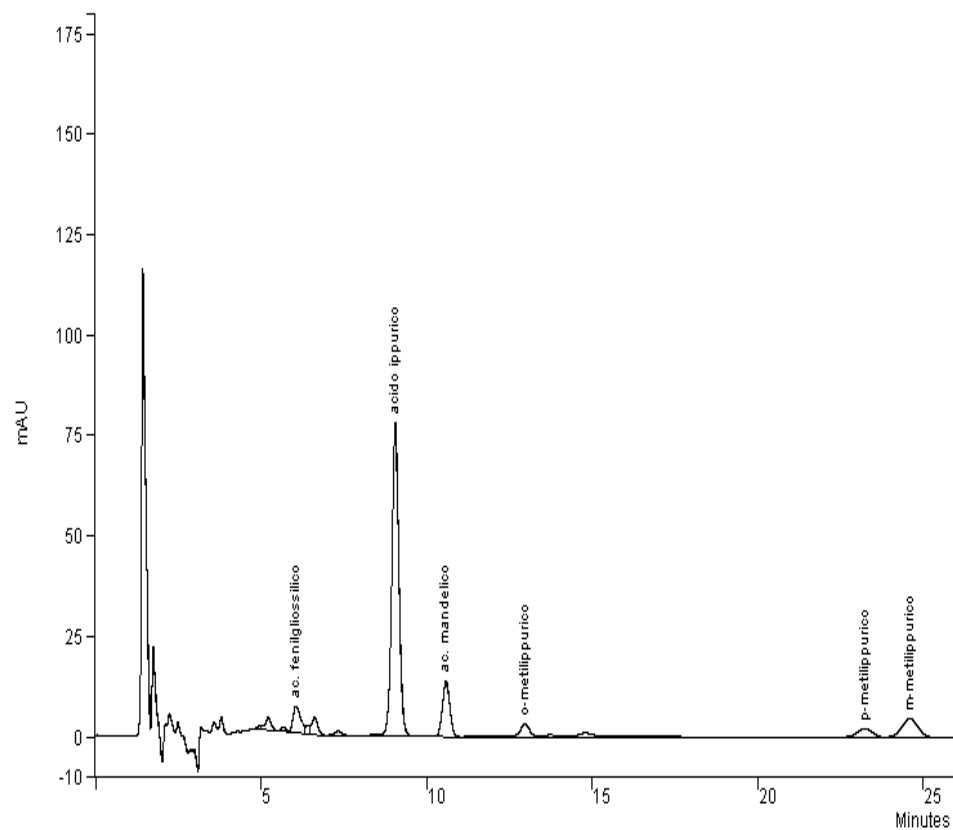


Fig. 6 : *Controllo liofilo urinario livello 1*

R.T. 6.02	Ac. Fenilgliossilico	381 mg/l
R.T. 9.02	Ac. Ippurico	694 mg/l
R.T. 10.56	Ac. Mandelico	124 mg/l
R.T. 12.95	Ac. o-Metilippurico	29 mg/l
R.T. 23.22	Ac. p-Metilippurico	31 mg/l
R.T. 24.59	Ac. m-Metilippurico	46 mg/l

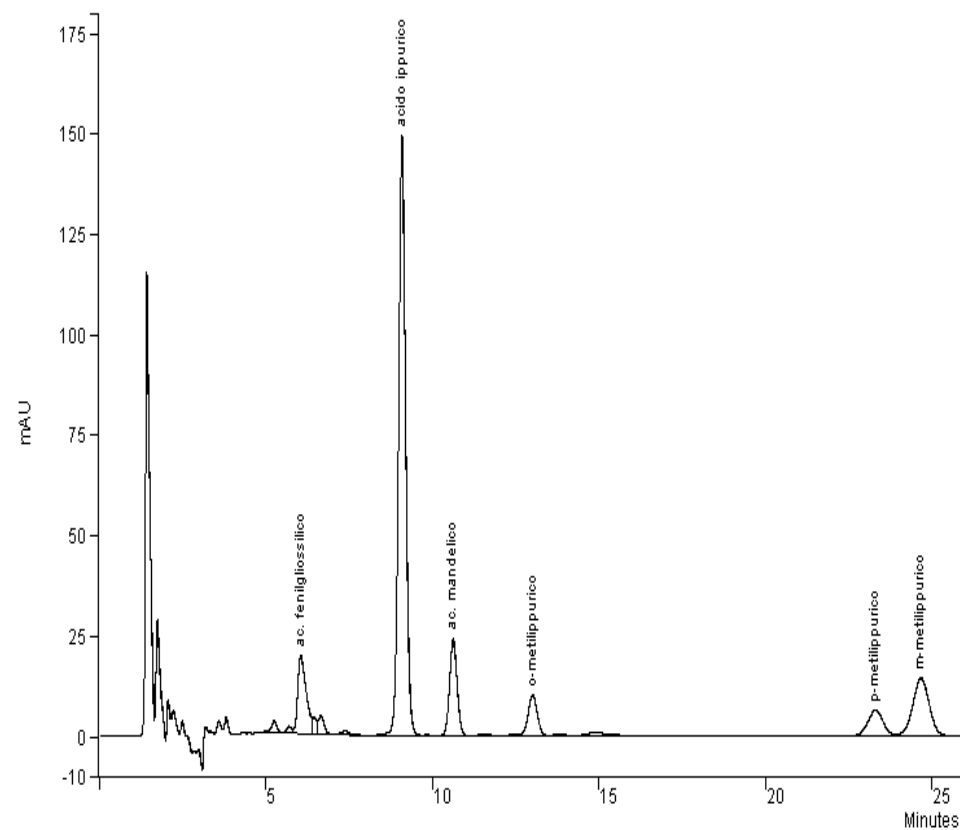


Fig. 7 : *Controllo liofilo urinario livello 2*

R.T. 6.02	Ac. Fenilgliossilico	1213 mg/l
R.T. 9.06	Ac. Ippurico	1307 mg/l
R.T. 10.60	Ac. Mandelico	221 mg/l
R.T. 12.99	Ac. o-Metilippurico	99 mg/l
R.T. 23.28	Ac. p-Metilippurico	80 mg/l
R.T. 24.65	Ac. m-Metilippurico	136 mg/l