

o-CRESOLO URINARIO in FLUORIMETRIA – Codice Z40010

BIOCHIMICA

L'o-CRESOLO è un metabolita urinario del Toluene, sostanza che viene impiegata nella produzione di materiali d'uso corrente (colle, vernici, lacche, inchiostri ecc.) ed è presente anche come microinquinante ambientale: questo fa sì che tutta la popolazione sia esposta a modeste concentrazioni di Toluene. Inoltre una sorgente indoor importante di Toluene è costituita dal fumo di tabacco.³

Il toluene viene assorbito attraverso i polmoni e più lentamente attraverso la cute; nell'organismo si ritrova in primo luogo nel sangue, successivamente si deposita nel tessuto adiposo. Il 20 % della dose assorbita viene eliminato tal quale dall'apparato respiratorio, l'80% viene biotrasformato: i principali metaboliti sono l'acido ippurico, l'o-cresolo e l'acido benzoico.¹

TOSSICITÀ

Esposizione acuta: irritazione delle prime vie aeree e depressione del SNC.

Esposizione cronica: intolleranza all'alcool, cefalea e disturbi del ritmo sonno-veglia; sintomi a livello epatico (epatomegalia) e a livello renale (nefrotossicità).¹

L'escrezione urinaria di o-CRESOLO è molto bassa: la velocità di eliminazione è di circa 1,08 mg/h e notevole è la variabilità interindividuale. Sono state riscontrate concentrazioni medie di 38 µg/g creatinina nei maschi e 25 µg/g creatinina nelle femmine.³

Il dosaggio a livello urinario è indice di esposizione al Toluene.

La classificazione della cancerogenicità dell'o-Cresolo è la seguente:²

EPA-C, MAK-3A, TLV-A4

Il presente metodo consente di determinare la concentrazione di o-Cresolo nelle urine, previa idrolisi.

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



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE del 27/10/1998 e del D.L. n.332 del 08/09/2000 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 015	o-Cresolo urinario in Fluorimetria	Maggio 2013
----------------	------------------------------------	-------------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

L'o-Cresolo, dopo idrolisi a 95 °C per 30 minuti, viene prima tamponato e poi diluito con opportuni solventi; la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo : 100 %

Sensibilità analitica (LLOD) : 0,002 mg/l

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) : 0,005 mg/l

Linearità del Metodo : 0,005 – 2 mg/l

CV% : 5,69% intra serie
10,81% inter serie

Valori accettabili in urine di fine turno : 300 µg/g di creatinina

Riferimento: ACGIH 2012

Contenuto della confezione :

Reagente A – Soluzione per Idrolisi, **1 x 20 ml**

Reagente B – Soluzione Diluente, **1 x 90 ml**

Reagente C – Soluzione Tampone, **1 x 90 ml**

Reagente D – Soluzione Test, **1 x 2 ml**

Reagente E – Calibratore liofilo, **1 x 500 µl**

Reagente M – Fase Mobile, **2 x 500 ml**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente ($\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Eccetto il **Reagente D** ed il **Reagente E** per i quali si rimanda di vedere le Avvertenze.

Vedere Avvertenze

Vedere Avvertenze

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl.
Detector Fluorimetrico $\lambda_{\text{EX}} = 270\text{ nm}$ $\lambda_{\text{EM}} = 300\text{ nm}$
Registrazione di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità di raccolta delle urine :¹

Momento di campionamento: fine turno (ACGIH);
dopo un periodo prolungato di esposizione, alla fine
della esposizione o del turno di lavoro (DFG).
Contenitore: provette in polietilene.
Conservante: non necessario.
Modalità di conservazione: a 4°C fino a 7 giorni

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test.

In una provetta pipettare :

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

Agitare al vortex per 10 secondi

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. 1. 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

Dispensare in provette in pyrex con tappo a vite in teflon:

	Calibratore	Campione
Reagente E – Calibratore	100 µl	
Campione		100 µl
Reagente A – Sol. per Idrolisi	150 µl	150 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Porre la serie di provette in stufa a 95 °C per 30 minuti.

Lasciar raffreddare a temperatura ambiente

FASE 3 : Aprire le provette e aggiungere 850 µl del **Reagente C – Soluzione Tampone**

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 4 : Diluizione finale ed iniezione

Prelevare 100 µl della soluzione tamponata preparata nella **FASE 3** e diluire in una vial di vetro con 900 µl di **Reagente B – Soluzione Diluente**

Agitare al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 4 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel Cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

o-CRESOLO URINARIO - Avvertenze

REAGENTE D : SOLUZIONE TEST

o-CRESOLO	circa 30,00 mg/l
Conservazione: stoccare a 2-8 °C	

REAGENTE E : CALIBRATORE URINARIO LIOFILO - Lotto n°

o-CRESOLO	mg/l
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 500 µl 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 liofili sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a -20 °C. Almeno 1 mese se conservati a 2-8 °C e 2 mesi a -20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza. Proteggere dalla luce.	
Confezionamento : 1 x 500 µl	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO 363 - VARIAN

λ_{EX}	270 nm
λ_{EM}	300 nm
SENSIBILITA'	2 - MEDIUM

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ, è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz) Codice S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo o Acetonitrile (20:80 v/v) 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 15 minuti anche a ricircolo di fase. 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. 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 E STOCCAGGIO DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di H ₂ O : Metanolo o Acetonitrile (90:10 v/v) al flusso di 1,2 ml/min per 30 minuti scaricandola. Flussare una soluzione di H ₂ O : Metanolo o Acetonitrile (20:80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H ₂ O : Metanolo o Acetonitrile (90:10 v/v) al flusso di 1,2 ml/min per 30 minuti scaricandola.

La colonna va stoccata ben chiusa in una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (20:80 v/v)

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di H ₂ O : Metanolo o Acetonitrile o Etanolo (80:20 v/v)
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 100 bar

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z40020	Standard Chimico per o-Cresolo	2 x 5 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



BIBLIOGRAFIA:

- 1- G Ital Med Lav Erg 2002; 24:3 Supp
- 2- Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene, ACGIH 2012
- 3- G.B. Bartolucci, P. Bavazzano, A. Perico, L. Perbellini. Valori di riferimento di solventi e metaboliti in campioni biologici. G Ital Med Lav Erg 2003; 25:1, 74-82
- 4-Schlatter, Astier. Rapid determination of o- and p-cresol isomers in urine from workers exposed to toluene by HPLC using chromatography using a graphitised carbon column. Biomed Chromatogr 1995 Nov-Dec; 9(6):302-4.
- 5-Inoue, Kanno, Kasai, Ukai, Okamoto, Ikeda. Benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary, marker of occupational exposure to toluene. Toxicol lett. 2004 Mar 1;147(2):177-86.

o-CRESOLO URINARIO
(Cromatogrammi di Riferimento)

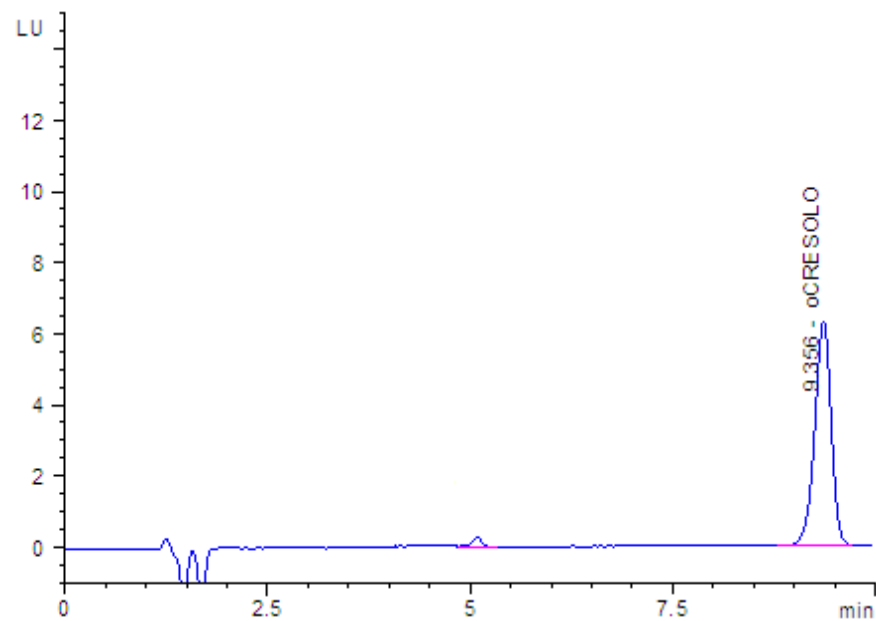


Fig. 1:	Soluzione Test
	R.T. 9.35 o-Cresolo

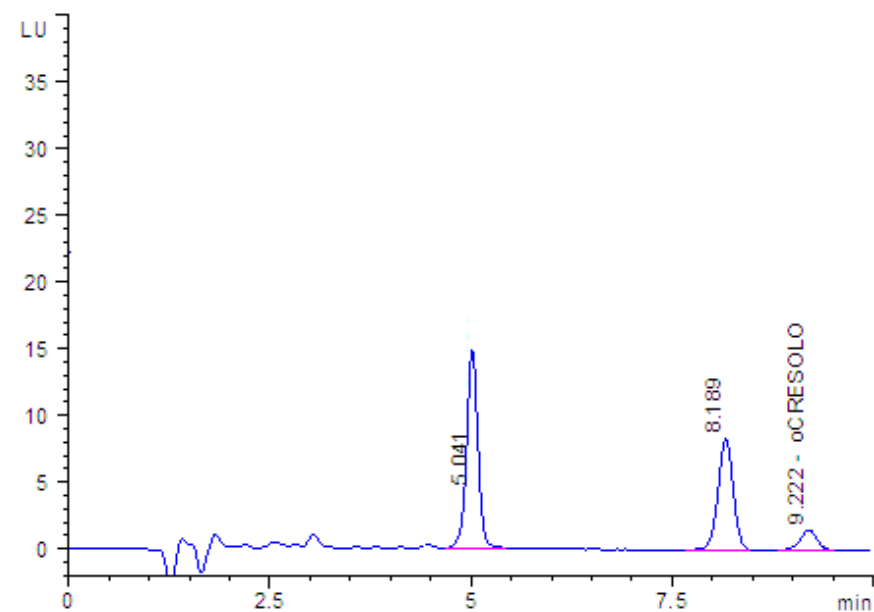


Fig. 2:	Calibratore liofilo urinario
	R.T. 9.22 o-Cresolo 1,44 mg/l

o-CRESOLO URINARIO (Cromatogrammi di Riferimento)

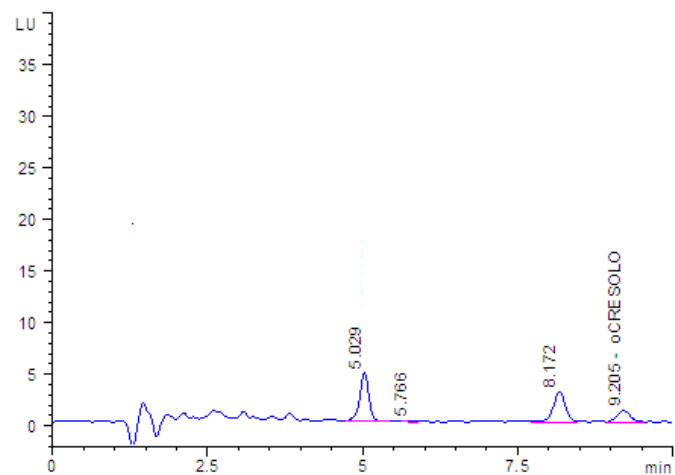


Fig. 3:	Controllo liofilo Livello 1
	R.T. 9.20 o-Cresolo 1,0 mg/L

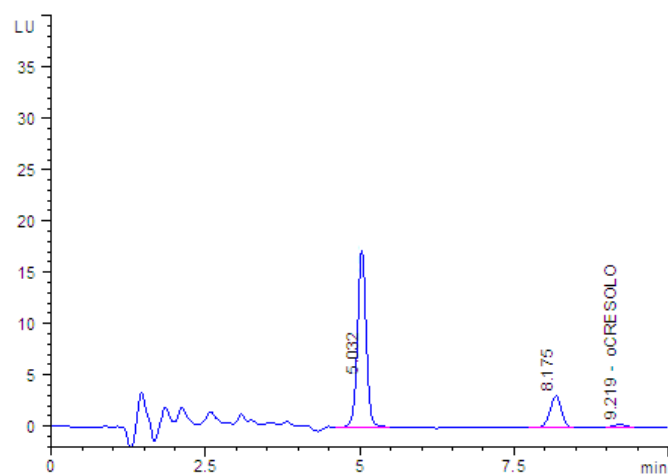


Fig. 4:	Veq G-equas
	R.T. 9.22 o-Cresolo 0,2 mg/l

