

ACIDO FORMICO URINARIO in Fluorimetria – Codice Z71010

BIOCHIMICA

Il *Metanolo* è utilizzato nella produzione di cellulosa, resine sintetiche, formaldeide, acido acetico e carburanti. La via di esposizione più importante è quella respiratoria. Il metanolo si distribuisce in modo omogeneo nei tessuti e nel sangue, viene metabolizzato nel fegato ed escreto nelle urine sotto forma di **Formaldeide, Acido Formico e CO₂**.

La maggior tossicità del metanolo non è dovuta alla molecola stessa ma all'acido formico suo metabolita.

L'*alcohol deidrogenasi* rappresenta la prima via metabolica che ossida il metanolo in formaldeide.

La successiva ossidazione della formaldeide ad acido formico avviene per opera dell'*aldeide deidrogenasi*, reazione estremamente rapida, tanto che in pazienti con intossicazione certa da metanolo non è possibile dosare la formaldeide né nei tessuti né nei liquidi biologici.

Anche l'esposizione al *diclorometano* nelle industrie (utilizzato come solvente, agente sgrassante e per togliere la vernice) può provocare un aumento dell'acido formico urinario in quanto il suo metabolismo comprende due vie: in una interviene il citocromo P450 che porta alla formazione del monossido di carbonio (CO); nell'altra via si ha la formazione di **Formaldeide → Acido Formico → CO₂**.

TOSSICITÀ

Dopo 6-18 ore dal momento dell'esposizione si osservano disturbi visivi (edema pupillare) e acidosi metabolica causati principalmente dall'acido formico il quale sarebbe anche il principale responsabile della neurite ottica.

Il Dosaggio del metanolo è utile solo se effettuato precocemente, mentre Il dosaggio dei formiati ha un'utilità maggiore e può essere utilizzato come indice della gravità dell'intossicazione.

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

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo:

Il presente metodo consente di determinare le concentrazioni urinarie dell' **Acido Formico** dopo derivatizzazione del campione urinario a 110°C per 16 ore. Il campione derivatizzato viene diluito ed iniettato nel cromatografo HPLC.

Recupero del Metodo: 100 %

Sensibilità del Metodo: 5 mg/l

Linearità del Metodo: 5 – 1000 mg/l

Valori di riferimento: < 80 mg/g creatinina

Contenuto della confezione:

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a temperatura ambiente (< 20 °C), eccetto il **Reagente B – Soluzione Derivatizzante** che è stabile 2 mesi a 2-8 °C una volta ricostituito.

Reagente A - Soluzione Tampone, 1 x 200 ml

Reagente B - Soluzione Derivatizzante, 3 x 25 mg

Ogni flacone va ricostituito con 5 ml di **Reagente E – Soluzione di Ricostituzione**

Reagente C - Soluzione Test/Standard chimico, 1 x 5 ml **Vedi Avvertenze**

Reagente D – Soluzione Diluente, 1 x 100 ml

Reagente E – Soluzione di Ricostituzione, 1 x 15 ml

Reagente M - Fase Mobile, 2 x 500 ml

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl
Detector fluorimetrico $\lambda_{ex}=267\text{ nm}$ $\lambda_{em}=320\text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di raccolta delle urine :

Urine di fine turno. Congelare il campione a -20 °C se l'analisi deve essere differita. Si mantiene stabile per 1 mese.

PROCEDURA PREANALITICA

FASE 1 : Ricostituzione del **Reagente B – Soluzione Derivatizzante**

Aggiungere 5 ml di **Reagente E - Sol. di Ricostituzione** al flacone contenente il Reagente B in polvere. Una volta ricostituito il Reagente B è stabile circa 2 mesi a 2–8 °C al riparo dalla luce.

FASE 2 : Derivatizzazione della Soluzione Test a 500 mg/l

Dispensare in provetta in pyrex con tappo a vite :

	Test
Reagente A – Soluzione Tampone	2000 µl
Reagente C – Soluzione Test	25 µl
Derivatizzante ricostituito	50 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Incubare a 110 °C per 16 ore

FASE 4 : Raffreddare

FASE 5 : Diluizione del Test derivatizzato

- 1000 µl di **Reagente D - Soluzione Diluente**
- 50 µl di Test derivatizzato

INIEZIONE :

Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 50 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dell' Acido Formico che deve essere simile a quello riportato in fig.2. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. **Importante** : Questo Test così ottenuto non deve essere usato come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione della soluzione Standard di Calibrazione a **100 mg/l**

In una provetta pipettare :

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente C - Standard Chimico**

IMPORTANTE: La soluzione standard di Calibrazione va preparata di volta in volta

FASE 2 : Derivatizzazione del Bianco (necessario come punto "0" di calibrazione), dello Standard di Calibrazione, dei Campioni e degli eventuali Controlli

Dispensare in provetta in pyrex con tappo a vite :

	Bianco	Standard	Controllo	Campione
Reagente A – Soluzione Tampone	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Acqua di grado HPLC	50 µl			
Standard di Calibrazione		50 µl		
Controllo			50 µl	
Campione				50 µl
Derivatizzante ricostituito	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Incubare a 110 °C per 16 ore

FASE 4 : Raffreddare

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

FASE 5 : Diluizione dei Campioni, dello Standard di Calibrazione e degli eventuali Controlli derivatizzati

- 1000 µl di **Reagente D - Soluzione Diluente**
- 50 µl di campione derivatizzato

INIEZIONE :

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

ACIDO FORMICO - Avvertenze

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST/STANDARD CHIMICO

ACIDO FORMICO	1000 mg/l
---------------	-----------

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{EX}	267 nm
λ_{EM}	320 nm
SENSIBILITA'	MEDIUM
TEMPO DI INTEGRAZIONE	5 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 μ , è tassativo l'uso della Guard Column Cartridge Holder/CARTUCCIA PRECOLONNA, cod. ZUCC270 e dei PREFILTRI per CARTUCCIA PRECOLONNA (1 x 10 pz.) cod. ZUCC752.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova 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. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** 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.

E' possibile effettuare analisi anche a ricircolo di fase; in tal caso si osserverà un progressivo ingiallimento della Fase Mobile che, in genere, non disturba la linearità della linea di base.

Se la temperatura 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 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 120 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

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

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z71020	Standard Chimico per Acido Formico	2 x 5 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C18 (4,6 x 150 mm, 4 μ)	1 PZ
ZUCC270	Guard Column Cartridge Holder / Cartuccia Precolonna	1 PZ
ZUCC752	Prefiltri per cartuccia Precolonna	1 x 10 PZ



ACIDO FORMICO URINARIO

(Cromatogrammi di Riferimento)

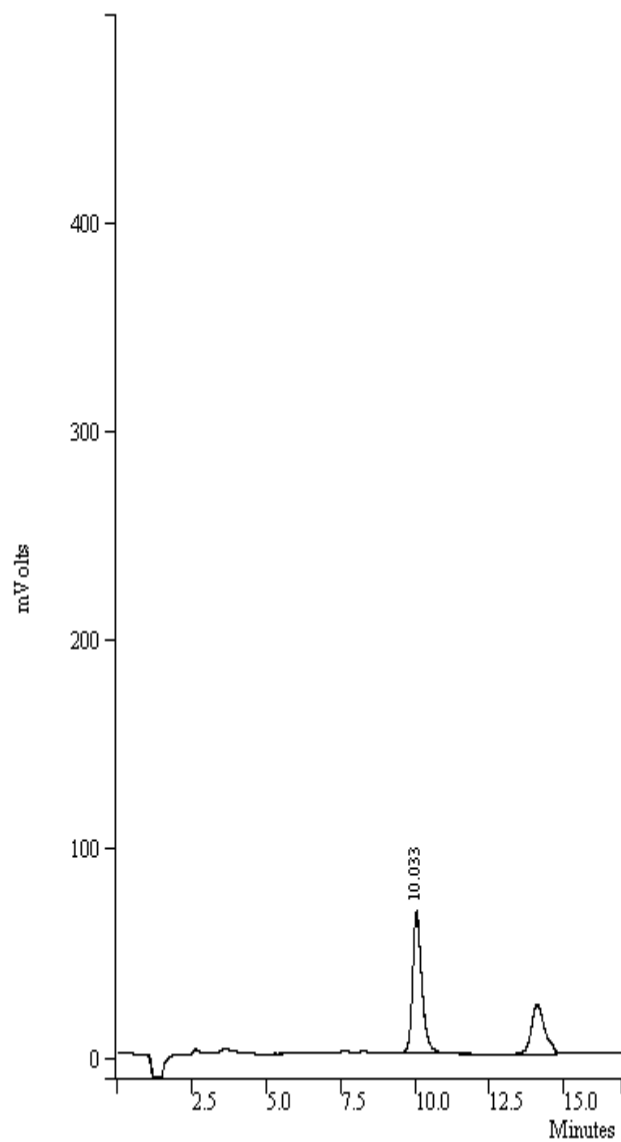


Fig. 1	Bianco
	R.T. 10.03 Acido Formico

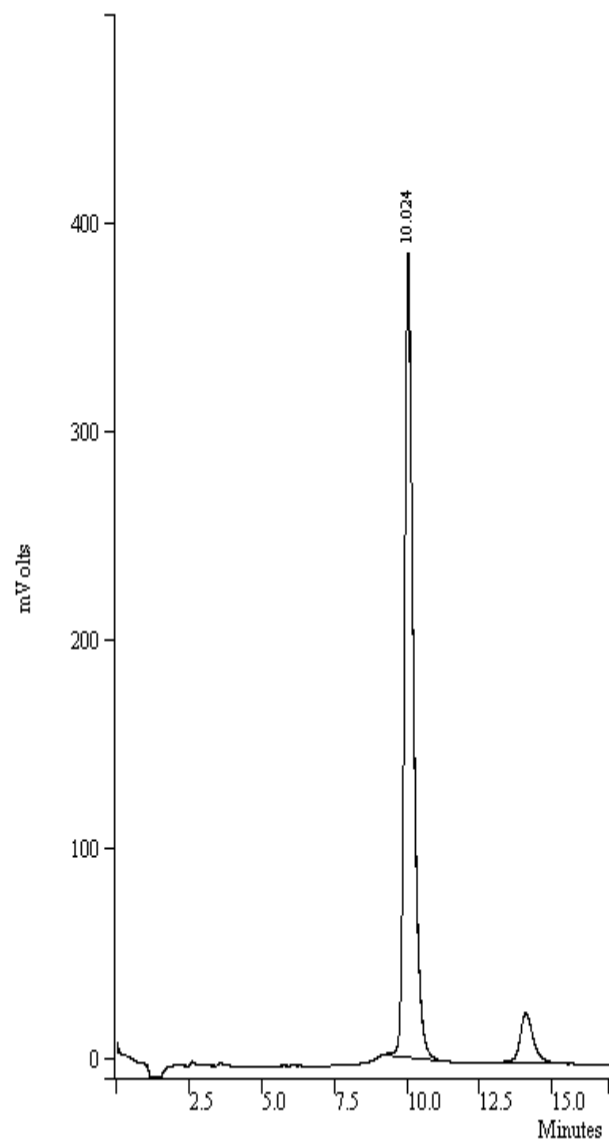


Fig. 2	Standard di Calibrazione
	R.T. 10.02 Acido Formico 250 mg/l

ACIDO FORMICO URINARIO

(Cromatogrammi di Riferimento)

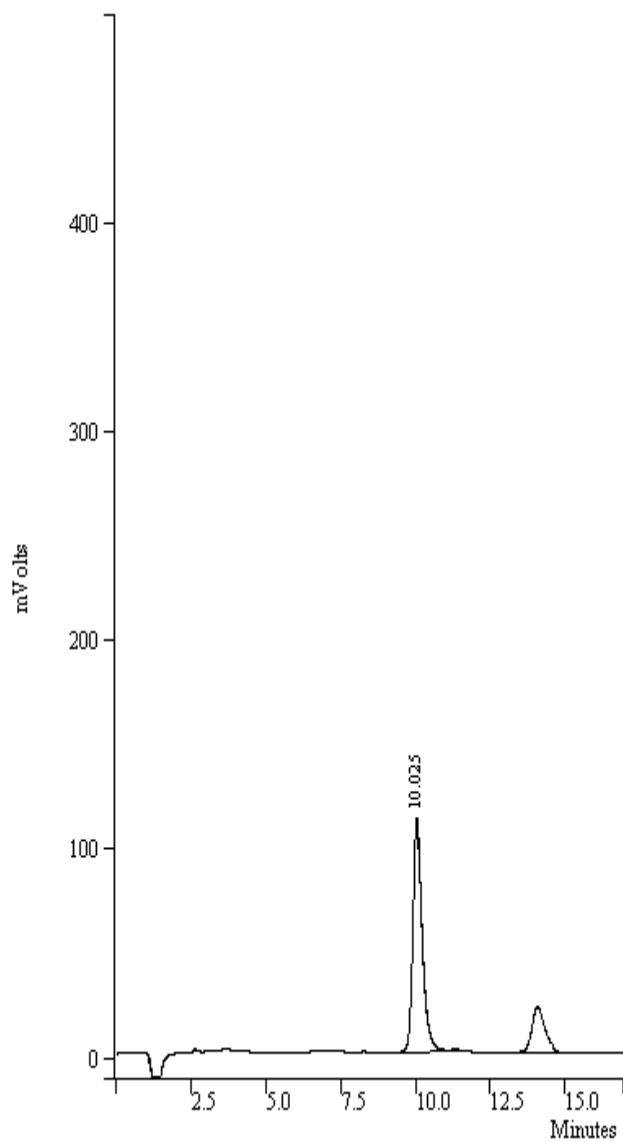


Fig. 3	Controllo urinario Livello 1
	R.T. 10.03 Acido Formico 50 mg/l

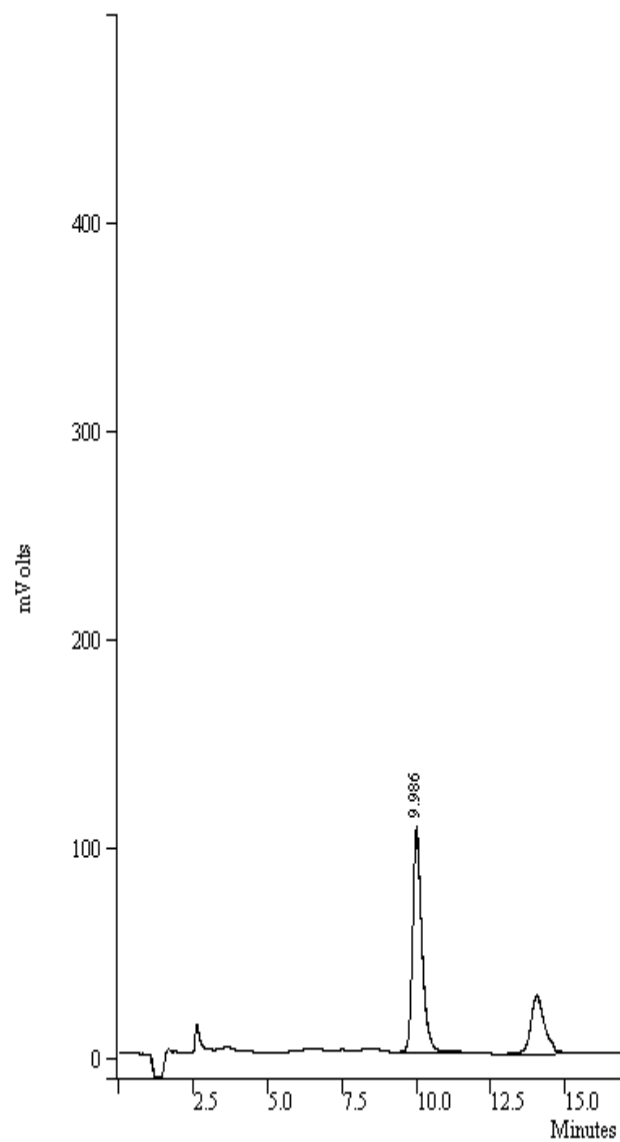


Fig. 4	Campione urinario
	R.T. 9.98 Acido Formico 47,9 mg/l