

IDROSSIPROLINA URINARIA in UV/VIS FAST – Codice Z01610

Caratteristiche chimiche

L'Idrossiprolina o (2s,4s)-4-Hydroxy-L-pyrrolidine-2-carboxylic acid, è un aminoacido secondario con un idrossile in posizione 4 sull'anello pirrolidinico, di PM=131,1.

Biochimica

L'Idrossiprolina è contenuta quasi esclusivamente nel collagene, dove rappresenta circa il 14% degli aminoacidi e proviene dalla idrossilazione della prolina.

Il collagene, principale componente della sostanza ossea, è una proteina la cui struttura primaria è costituita da una sequenza ripetitiva di glicina, prolina, idrossiprolina e idrossilisina.

Poiché circa la metà del collagene totale risiede nel tessuto osseo, un riassorbimento osseo causa un impoverimento di collagene e la liberazione di quantità di Idrossiprolina tanto maggiori quanto maggiore sarà la distruzione del collagene stesso.

Infatti, a causa dei fenomeni di riassorbimento osseo, l'idrossiprolina non viene più riutilizzata ed aumenta la sua escrezione urinaria.

Essa subisce dapprima una filtrazione a livello del glomerulo renale e successivamente un riassorbimento, per il 90 %, a livello dei tubuli; il 10 % rimanente subisce una eliminazione renale.

Per tali ragioni il suo dosaggio urinario è utilizzato come marker di aumentato riassorbimento osseo (per es. osteoporosi postmenopausa, morbo di Paget, neoplasie con lesioni ossee, osteomalacia, ustioni, ipertiroidismo, osteomielite acuta).

Esistono numerosi studi sull'osteoporosi che correlano le concentrazioni dell'idrossiprolina urinaria con misure dirette del riassorbimento osseo (es. Densitometria ossea, cinetica del calcio); nell' osteoporosi post-menopausa si evidenzia che più del 30% delle pazienti hanno valori elevati di idrossiprolina.

Si può quindi concludere che l'**Idrossiprolina urinaria** è un importante **marker** di riassorbimento osseo.

 EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



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.

N° 011	Idrossiprolina urinaria in UV/Vis - FAST	06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo:

L'idrossiprolina, dopo idrolisi acida a 110 °C per 16 ore, viene **derivatizzata** e iniettata nell'HPLC.

Recupero del Metodo :

100%

Sensibilità del Metodo :

0,1 mg/l

Range dinamico del metodo :

0,1 – 300 mg/l

Range di normalità nelle urine delle 24 h :

10,4 – 22,6 mg/l

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso, eccetto il Reagente C che va ricostituito, e stabili 3 anni a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Alcalina, **1 x 50 ml**

Reagente B – Soluzione Tampone, **1 x 50 ml**

Reagente C – Soluzione Derivatizzante 1, **3 x 1,2 ml**

Da ricostituire con **3 ml** di Acetonitrile (non fornito nel kit). **Dopo ricostituzione il Reagente C è stabile 6 mesi a 2-8°C.**

Reagente D – Soluzione Derivatizzante 2, **1 x 10 ml**

Reagente H – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Calibratore liofilo, **1 x 5 ml**

Codice Z01016

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Reagente J – Soluzione Standard interno, **1 x 10 ml**

Reagente W – Sol. Acidificante, **1 x 10 ml**

Reagente M – Fase Mobile, **3 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 20 o 50 µl
Detector Spettrofotometrico $\lambda = 495 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di raccolta delle Urine delle 24 h :

Prima di iniziare la raccolta versare nel recipiente circa 5 ml di HCl 5 M per ogni litro di Urina che presumibilmente verrà emessa. Per la raccolta di una persona adulta occorreranno circa 10 ml. Per la raccolta di un bambino occorreranno circa 5 ml. Un campione di circa 10 ml di urina delle 24 h va prelevato ed inviato al Laboratorio con l'indicazione della diuresi totale. Congelare il campione a –20 °C se l'analisi deve essere differita. Stabile oltre 2 mesi.

AVVERTENZE PER LA RACCOLTA : I pazienti dovranno seguire un regime dietetico, almeno nelle 24 h che precedono la raccolta delle urine delle 24 h, escludendo alimenti che contengono collagene (carne e suoi derivati, pesce, dolci e prodotti contenenti gelatina).

PROCEDURA PREANALITICA

Prima di procedere all'analisi è consigliabile effettuare una prova di verifica del sistema analitico mediante l'analisi della Soluzione Test, omettendo di aggiungere lo Standard Interno. Seguire la seguente procedura :

Pipettare in provetta conica di PP con tappo da 1,5 ml :

- 90 µl di **Reagente B** – Sol. Tampone
- 10 µl di **Reagente H** – Sol. Test
- 40 µl di **Reagente D** – Sol. Derivatizzante 2
(verificare che il pH sia ± 9.0)

Chiudere la provetta conica, al Vortex per 10 secondi

Incubare a temperatura ambiente per 45 minuti

INIEZIONE :

- Iniettare 20 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia un tempo di ritenzione simile a quello riportato 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.

La soluzione così preparata può essere riutilizzata come Test per le successive sedute analitiche, purchè si abbia l'accortezza di aliquotarla e stoccarla in congelatore a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (stabile circa 1 mese).

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei campioni

Idrolisi acida dei campioni :

- Pipettare in una provetta di vetro idonea con **tappo a vite e setto in teflon** a tenuta, 500 µl di Calibratore o Controllo o Campione di urina e aggiungere 500 µl di HCl 12 N (*non fornito nel kit*)
- Chiudere le provette e porle a 110 °C per 16 h

FASE 2 : Preparazione dei campioni per la derivatizzazione

Togliere i campioni dalla stufa e raffreddarli. **L'idrolizzato può essere ali quotato e conservato a – 20 °C. Stabile circa 1 mese.**

Trasferire in provetta di plastica da 10 ml in sequenza :

- 100 µl di Idrolizzato
- 500 µl di **Reagente A – Soluzione Alcalina con Standard Interno** **Attenzione** : Sviluppo di bollicine di CO₂
- 50 µl di KOH concentrato 30% (*non fornito nel kit*)
- 500 µl di **Reagente B – Soluzione Tampone**
- 100 µl di **Reagente J – Soluzione Standard interno**

Al vortex per 10 secondi

Controllare che il pH della soluzione abbia un valore di circa 9,0

FASE 3 : Derivatizzazione

Trasferire in vials di vetro da 2,0 ml con tappo a vite:

- 100 µl della soluzione precedentemente preparata
- 100 µl di **Reagente C – Soluzione Derivatizzante 1** (dopo ricostituzione del flacone con **3 ml** di Acetonitrile)

Al Vortex per 10 secondi

Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti

Aggiungere :

- 100 µl di **Reagente D – Soluzione Derivatizzante 2**

Chiudere la vial, al Vortex per 10 secondi

Incubare a temperatura ambiente per 45 minuti

Al termine aggiungere:

- 100 µl di **Reagente W – Soluzione Acidificante**

Al vortex per 10 secondi

FASE 4 : Centrifugare a 5.000 rpm per 5 minuti

La soluzione così ottenuta è stabile oltre 48 h se tenuta in provetta chiusa, possibilmente al riparo dalla luce, a 2–8 °C

INIEZIONE :

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

IDROSSIPROLINA URINARIA in UV/VIS FAST – Avvertenze

REAGENTE H : SOLUZIONE TEST

IDROSSIPROLINA	Circa 20 mg/l
-----------------------	---------------

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTOFOTOMETRICO – VARIAN

λ	495 nm
GAIN	Low o Medium
TEMPO DI INTEGRAZIONE	4 o 8

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare colonna analitica POROSHELL EC C18 (50 x 4,6 mm – 2,7 μ) è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Reverse Phase POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ) e far passare una soluzione di Acqua : Acetonitrile (20:80 v/v), al flusso di 0,8 ml/minuto per 25 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1ml/min per circa 30 minuti. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. Al termine, iniettare il test derivatizzato e verificare la congruità della separazione.
Per l'analisi della Idrossiprolina NON è consigliato lavorare a ricircolo di fase.
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. Una volta conclusa la seduta lavare la colonna analitica con una soluzione composta dal 90% di Acetonitrile + 10% di Acqua per 1 ora.

PARAMETRI HPLC

LOOP	20 o 50 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 110 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z01016	Calibratore liofilo urinario per Idrossiprolina	4 x 5 ml
Z10559	Controllo liofilo in urina per Amine Biogeniche - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
Z01611	Fase Mobile	4 x 500 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120, EC-C18 (50 x 4,6 mm - 2,7 μ m)	1 Pz
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 Pz
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 Pz
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 Pz
Z1636/26	Provette Pirex da 10 ml con tappo SWL (per idrolisi, fino a 300 °C-lavabili e riutilizzabili)	1 x 40 Pz



IDROSSIPROLINA URINARIA IN UV/VIS FAST (Cromatogrammi di Riferimento)

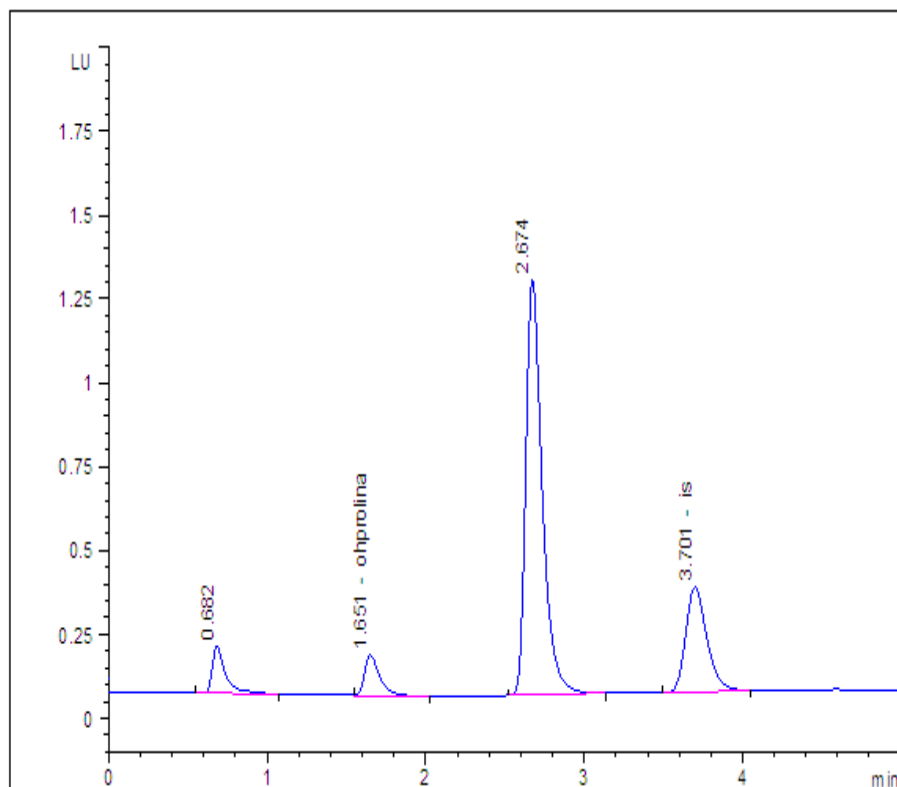


Fig. 1 :	Calibratore liofilo urinario		
	R.T. 1.65	Idrossiprolina	19,6 mg/l
	R.T. 3.70	Standard Interno	

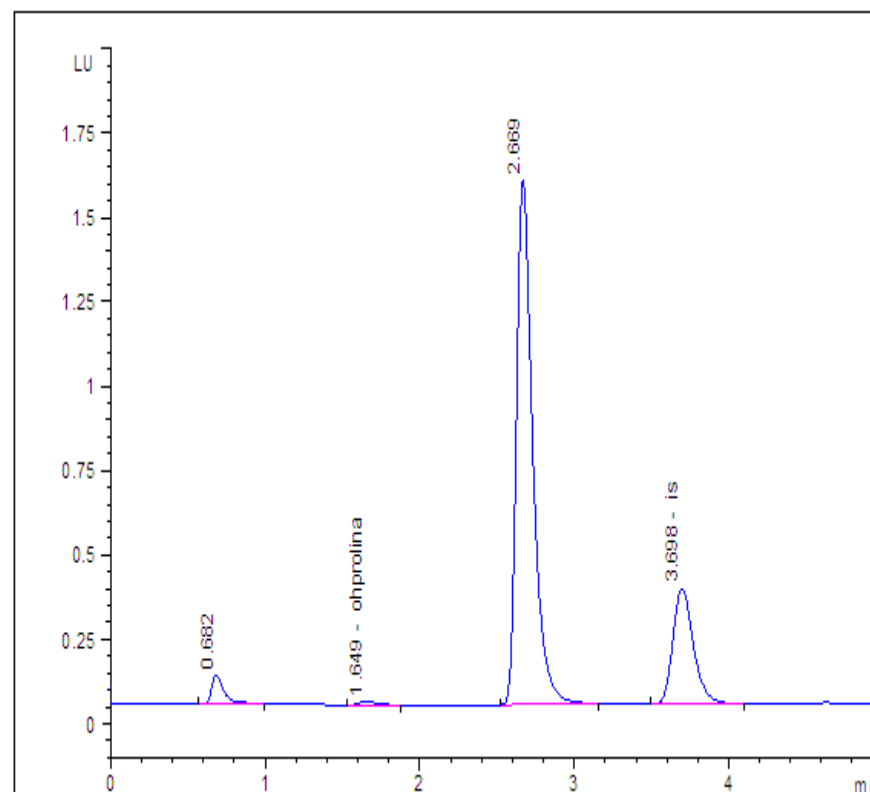


Fig. 2 :	Controllo liofilo urinario		
	R.T. 1.65	Idrossiprolina	1,5 mg/l
	R.T. 3.69	Standard Interno	