

2,5 ESANDIONE URINARIO TOTALE in UV - FAST – Codice Z05210

BIOCHIMICA

Il **2,5 Esandione o Acetonylacetone** è un dichetone alifatico prodotto dalla trasformazione biochimica dell'idrocarburo alifatico "**Esano**".

Questo idrocarburo alifatico, presente come solvente nelle colle usate soprattutto dall'industria calzaturiera, una volta assunto dall'organismo viene immediatamente metabolizzato fino a trasformarsi in **2,5 Esandione**, il quale, sotto forma di glucuronide, viene escreto con le urine.

Il **2,5 Esandione** viene ricercato nelle urine e determinato quantitativamente per accertare il grado di esposizione individuale poichè la concentrazione urinaria è proporzionale alla quantità di Esano inspirato nell'aria durante il ciclo lavorativo.

Il **2,5 Esandione** viene ritenuto il diretto responsabile delle **polineuropatie** che si riscontrano tra gli addetti dell' industria calzaturiera.

ANALISI CHIMICA HPLC

Il **2,5 Esandione** (PM=114,14) è un dichetone alifatico abbastanza volatile, non analizzabile direttamente poichè scarsamente sensibile all'Ultravioletto.

Il presente metodo consente di determinare quantitativamente le concentrazioni urinarie del **2,5 Esandione** in HPLC senza doverlo estrarre con solventi e concentrarlo per evaporazione del solvente.

Dopo idrolisi acida il **2,5 Esandione** viene derivatizzato con un reagente specifico per i chetoni e iniettato direttamente in HPLC isocratico.

 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



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.

N° 002	Esandione urinario totale in UV - FAST	06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

Il 2,5 Esandione-glucuronide viene idrolizzato in ambiente acido a 100 °C per 1 ora. Dopo raffreddamento, viene aggiunto il derivatizzante e la soluzione viene posta a 70 °C per 30 minuti. Dopo raffreddamento 50 µl di soluzione vengono iniettati direttamente in HPLC.

Recupero del Metodo : 100%

Sensibilità del Metodo (LLOD) : 0,016 µg/ml

Minima Concentrazione analizzabile (LLOQ) : 0,05 µg/ml

Linearità : 0,05 - 50,0 µg/ml

Valori accettabili in soggetti non esposti : < 0,5 mg/g creatinina

Valori accettabili in urine di fine turno : < 5 mg/g creatinina

Accuratezza intra serie (errore relativo %) : *Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2002;24:3 Suppl*

Ci	Cs
0,2 µg/ml	6,25 µg/ml
9,78%	2,18%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
0,2 µg/ml	6,25 µg/ml
9,78%	2,12%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 µg/ml	3,125 µg/ml	12,5 µg/ml
3,61%	2,81%	2,21%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 µg/ml	3,125 µg/ml	12,5 µg/ml
10,05%	3,76%	2,45%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev Std 0,9945 ± 0,0069

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a temperatura ambiente (≤ 20 °C)

Reagente A - Soluzione derivatizzante, 2 x 10 ml

Reagente B - Soluzione Test / Standard chimico 390 mg/l, 1 x 5 ml **Stoccare a 2-8 °C**

Reagente C - Soluzione Std interno, 1 x 1 ml

Reagente M - Fase mobile, 4 x 500 ml

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 μ l
Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda=334$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità per il prelievo urinario :

Alla fine del turno lavorativo, raccogliere 10 ml di urine in una provetta idonea. Stabile 4 settimane a -20 °C.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test a 39 mg/l

In una provetta pipettare :

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

Si otterrà una soluzione test contenente 39 mg/l.

In una provetta da 1,5 ml pipettare:

- 200 µl di **Sol. Test a 39 mg/l**
- 200 µl di **Reagente A** - Sol. Derivatizzante. **Al vortex per 10 secondi**
- Incubare a 70 °C per 30 minuti **Raffreddare**

INIEZIONE :

- Iniettare 10 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.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dello standard chimico di lavoro a 3,9 mg/l

In una provetta pipettare :

- 9,9 ml di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente B** - Standard Chimico

Si otterrà una soluzione standard contenente 3,9 mg/l

IMPORTANTE : Tale soluzione standard di lavoro va preparata di volta in volta

FASE 2 : Preparazione dei Campioni

Dispensare in provette di vetro con tappo a vite in teflon idonee per idrolisi :

	Bianco	Standard	Campione
Acqua di grado HPLC	2,0 ml		
Standard chimico		2,0 ml	
Campione			2,0 ml
Acido Cloridrico concentrato	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Porre la serie di provette in stufa a 100 °C per 1 ora

Lasciar raffreddare a temperatura ambiente e **Agitare al vortex per 10 secondi**

FASE 4 : Centrifugare a 4.000 rpm x 5 minuti

FASE 5 : Procedura di derivatizzazione

- Prelevare 200 µl di Sovranatante
- Aggiungere 10 µl di **Reagente C** - Std interno
- Aggiungere 200 µl di **Reagente A** - Sol. derivatizzante **Al vortex per 10 secondi**

FASE 6 : Porre la serie di provette in stufa a 70 °C per 30 minuti

Lasciar raffreddare a temperatura ambiente

N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

2,5 ESANDIONE URINARIO TOTALE - Avvertenze

REAGENTE B : STANDARD CHIMICO / SOLUZIONE TEST

2,5 Esandione	390 mg/l
---------------	----------

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	334 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 100 mm, 3,5 μ , è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 100 mm, 3,5 μ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) al flusso di 1,0 ml/minuto. <u>Non riciclare i liquidi di lavaggio.</u> Far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v/v) al flusso di 1,0 ml/minuto. <u>Non riciclare i liquidi di lavaggio.</u> Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare Test chimico e verificare la congruità della separazione. Non è possibile effettuare analisi 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. Flussare 15 ml di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v) al flusso di 1,0 ml al minuto e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v) per 30 minuti scaricandola. Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v).

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,8 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 131 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z05020	Standard chimico per 2,5 Esandione urinario	2 x 5 ml
Z959961902	Colonna Analitica Zorbax Eclipse Plus C 18 (100 x 4,6mm -3.5 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



2,5 ESANDIONE URINARIO (Cromatogrammi di Riferimento)

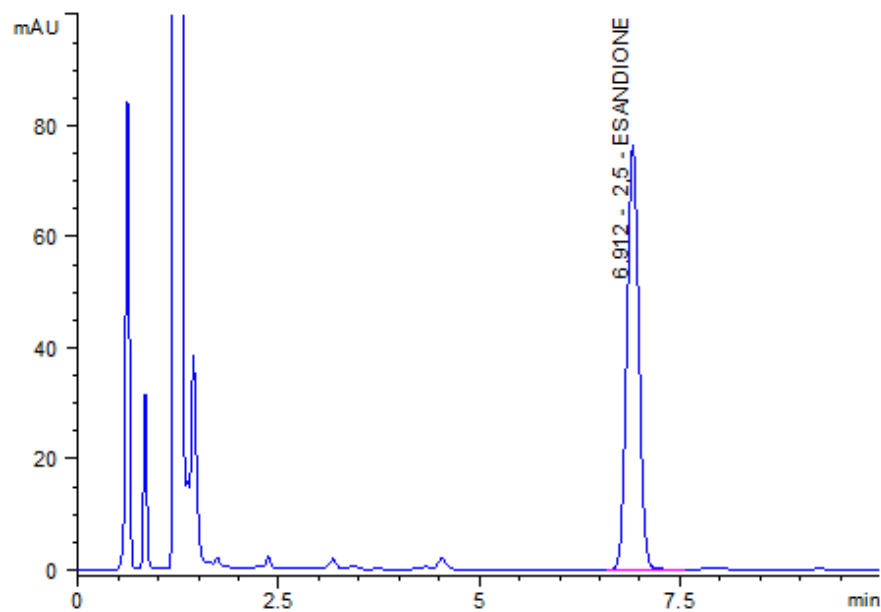


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 6.91 2,5 Esandione

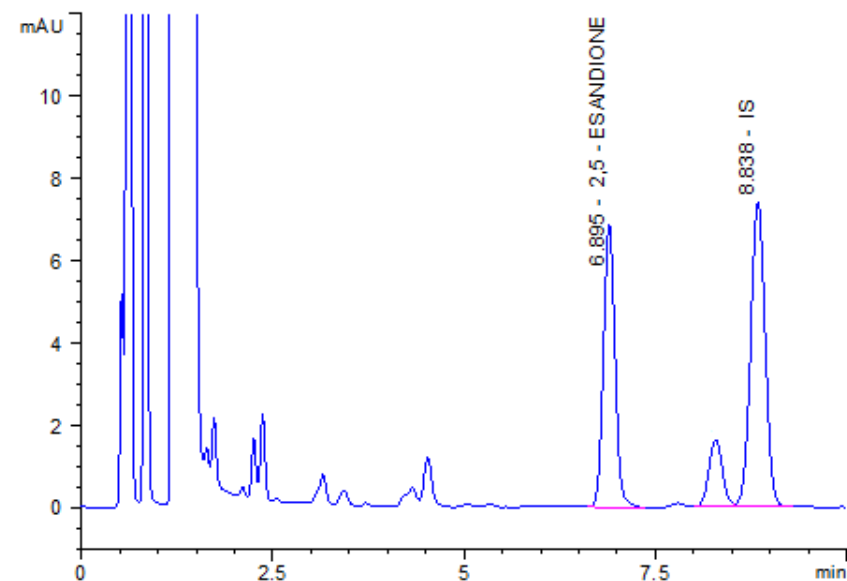


Fig. 2 :	Standard di calibrazione in soluzione acquosa
	R.T. 6.89 2,5 Esandione 3,9 mg/l
	R.T. 8.83 Std interno

2,5 ESANDIONE URINARIO (Cromatogrammi di Riferimento)

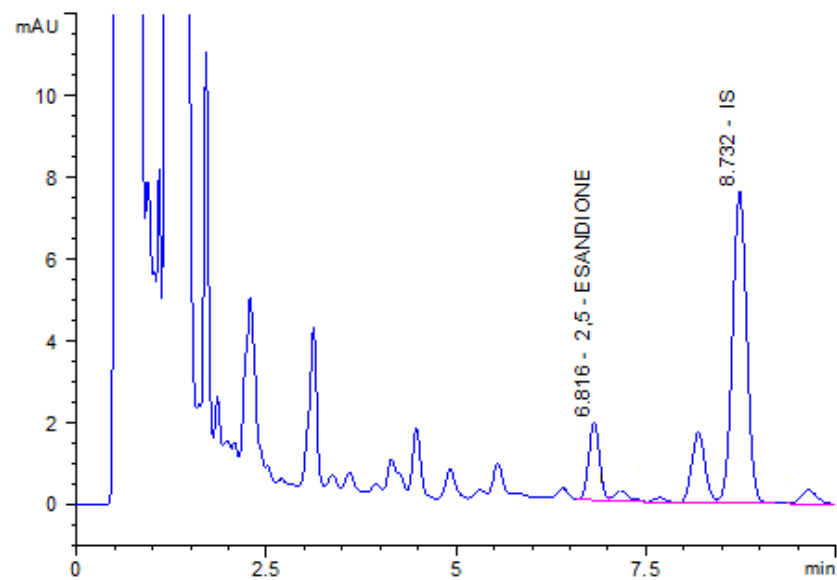


Fig. 3 :	Campione urinario		
	R.T. 6.81	2,5 Esandione	0,98 mg/l
	R.T. 8.73	Std interno	