

BIOCHIMICA

La determinazione dell'**Acido Ippurico** 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.1)

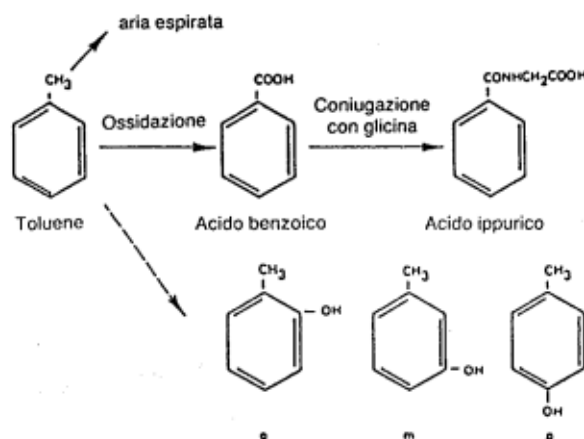


Fig. 1 : Biotrasformazione del toluene in vivo

La determinazione degli **Acidi o-m-p-Metilippurici** 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. 2)

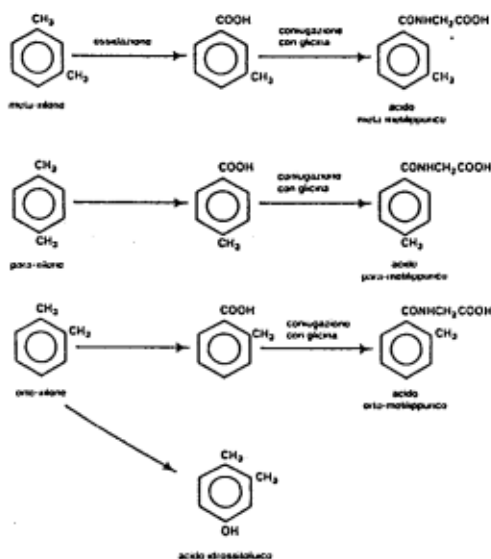


Fig. 2 : Biotrasformazione dello Xilene in vivo

 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.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L'Acido Ippurico e gli Acidi o-m-p-Metil-Ippurici vengono analizzati previa diluizione con una soluzione diluente. La soluzione così ottenuta viene iniettata direttamente in HPLC.

Recupero del Metodo : >98%

Sensibilità del Metodo (LLOD) : 5 mg/l

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) : 15 mg/l

Linearità del Metodo : 15 – 3000 mg/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Acido Ippurico :

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
4,7%	2,8%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Acido Ippurico :

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
4,2%	4,2%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Acido Ippurico :

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
6,8%	3,0%	0,6%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Acido Ippurico :

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,9%	3,2%	2,8%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. std: 0,9959 ± 0,0024 Acido Ippurico

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Acido o-Metilippurico:

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
5,6%	1,8%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Acido o-Metilippurico:

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
8,2%	3,9%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Acido o-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,7%	2,3%	1,7%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Acido o-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
8,9%	3,7%	0,7%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. std:

0,9942 ± 0,0025 Acido o-Metilippurico

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Acido m-Metilippurico :

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
2,1%	2,6%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Acido m-Metilippurico:

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
4,7%	3,2%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Acido m-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,3%	2,6%	0,9%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Acido m-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,5%	3,4%	0,6%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. std:

0,9963 ± 0,0027 Acido m-Metilippurico

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Acido p-Metilippurico:

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
3,2%	2,2%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Acido p-Metilippurico:

Ci	Cs
300 mg/l	1500 mg/l
3,5%	4,3%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Acido p-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,0%	2,1%	0,8%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Acido p-Metilippurico:

C LLOQ	Cm	CA
200 mg/l	600 mg/l	1800 mg/l
7,9%	2,8%	0,5%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. std:

0,9956 ± 0,0029 Acido p-Metilippurico

Valori accettabili in soggetti non esposti :

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

Valori accettabili in urine di fine turno :

Ac. Ippurico : < 1600 mg/l
Ac. o-m-p-Metilippurici totali : < 1500 mg/l
Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2002;24:3 Suppl

Ac. o-m-p-Metilippurici totali : 1,5 g/g creatinina
Riferimento: ACGIH 2020

<u>Contenuto della confezione :</u>	Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente ($\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Il Calibratore è stabile 36 mesi a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Reagente A – Soluzione diluente, 1 x 100 ml	
Reagente C – Soluzione Test, 1 x 2 ml	<u>Stoccare a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$</u>
Calibratore urinario liofilo , 1 x 5 ml	<u>Codice Z06016</u> <u>Confezionato a parte - vedi scheda tecnica</u>
Reagente M – Fase mobile, 2 x 500 ml	

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da $5\text{ }\mu\text{l}$
 Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda=207\text{ nm}$
 Registratore di cromatogrammi

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 $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 6 mesi – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta pipettare :

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

Al vortex per 10 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 5 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. 3. 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 idonee dispensare in sequenza :

	Bianco	Calibratore	Campione
Reagente A – Sol. diluente	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Acqua di grado HPLC	10 µl		
Calibratore		10 µl	
Campione			10 µl

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 5 µl del sovranatante nel cromatografo HPLC.

ACIDO IPPURICO E ACIDI o-m-p- METIL IPPURICI URINARI - Avvertenze

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST

Acido IPPURICO	Circa 1.000 mg/l
Acido o-Metil IPPURICO	Circa 1.000 mg/l
Acido m-Metil IPPURICO	Circa 500 mg/l
Acido p-Metil IPPURICO	Circa 500 mg/l

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

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

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ).
Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Metanolo (20 : 80 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Metanolo (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione.
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 DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 15 ml di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)** per 30 minuti scaricandola. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.** La colonna va stoccata in una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)**

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).

PARAMETRI HPLC

LOOP	5 μ l
Flusso di lavoro consigliato	0,8 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

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
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120-EC-C 18 (50 x 4,6mm -2,7 μ m)	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

ACIDO IPPURICO/ACIDI o-m-p-METILIPPURICI URINARI (Cromatogrammi di riferimento)

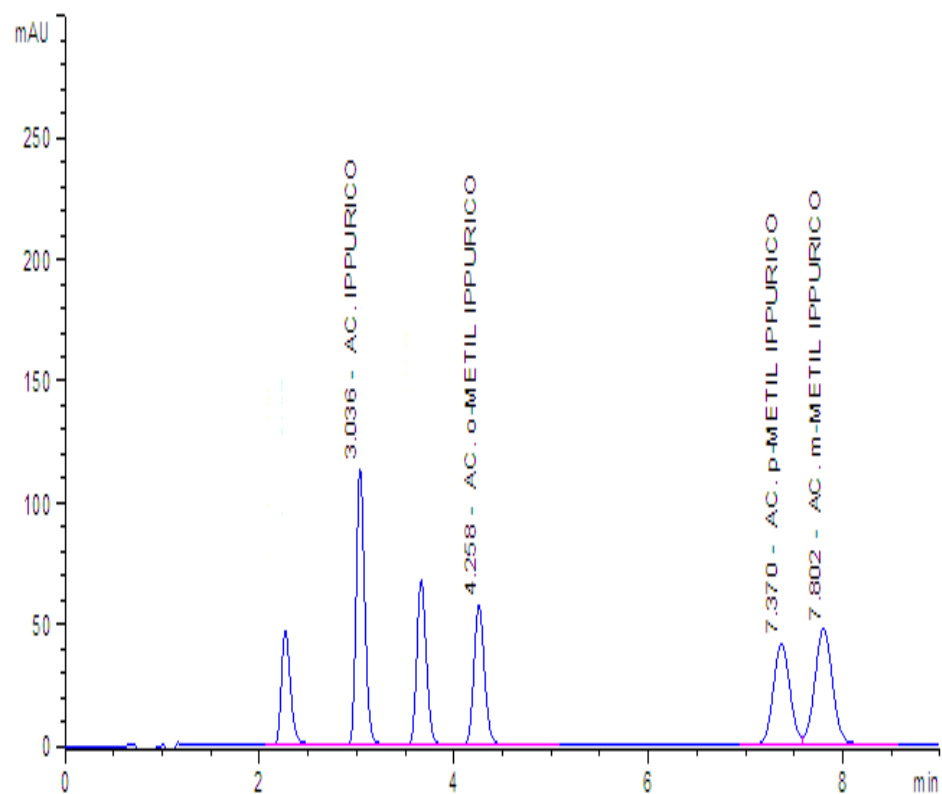


Fig. 3 Soluzione Test

R.T. 3.03	Acido Ippurico
R.T. 4.25	Acido o-Metilippurico
R.T. 7.37	Acido p-Metilippurico
R.T. 7.80	Acido m-Metilippurico

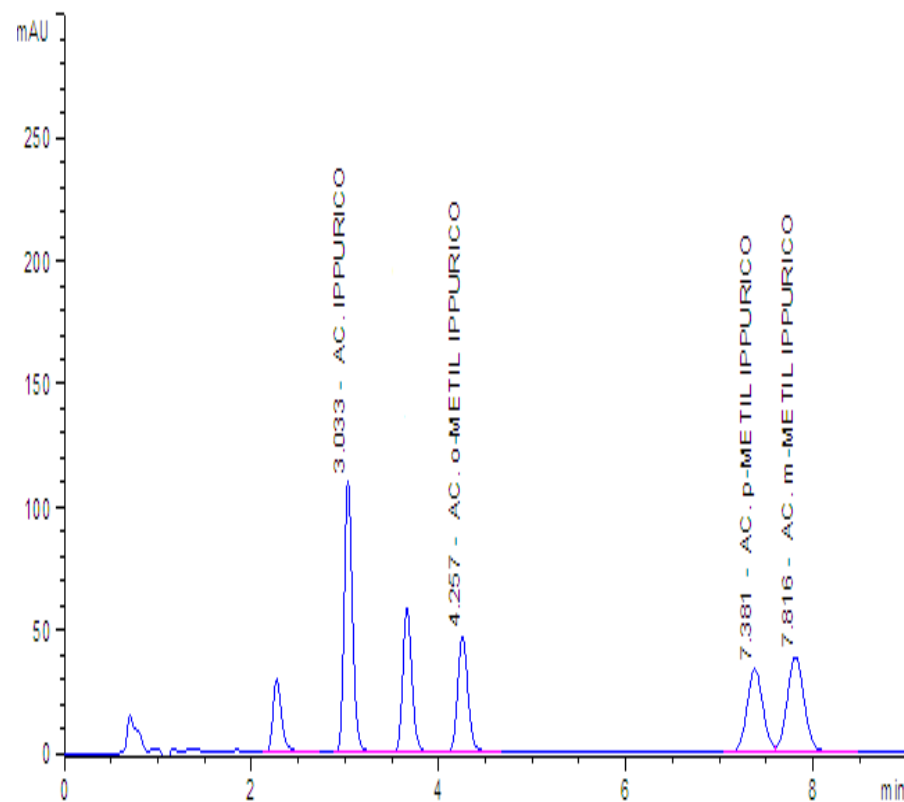


Fig. 4 Calibratore liofilo urinario

R.T. 3.03	Acido Ippurico	1.481,6 mg/l
R.T. 4.25	Acido o-Metilippurico	479,4 mg/l
R.T. 7.38	Acido p-Metilippurico	485,6 mg/l
R.T. 7.81	Acido m-Metilippurico	490,8 mg/l

ACIDO IPPURICO/ACIDI o-m-p-METILIPPURICI URINARI
(Cromatogrammi di riferimento)

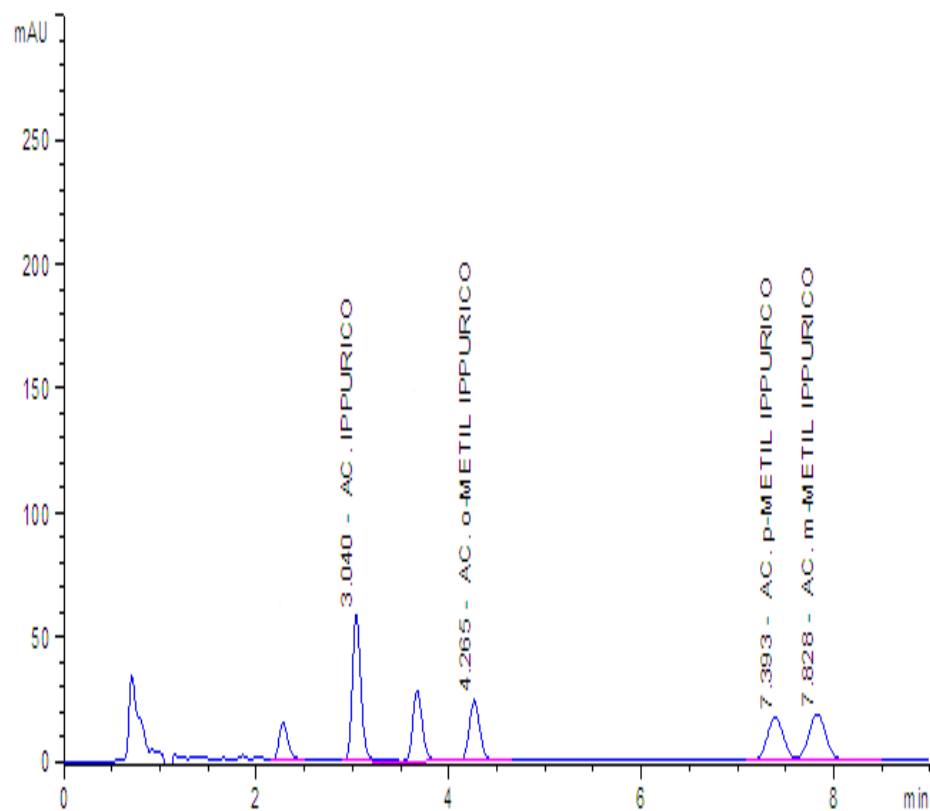


Fig. 5	Controllo liofilo urinario livello 1		
	R.T. 3.04	Acido Ippurico	599,9 mg/l
	R.T. 4.25	Acido o-Metilippurico	176,8 mg/l
	R.T. 7.30	Acido p-Metilippurico	182,7 mg/l
	R.T. 7.82	Acido m-Metilippurico	159,7 mg/l

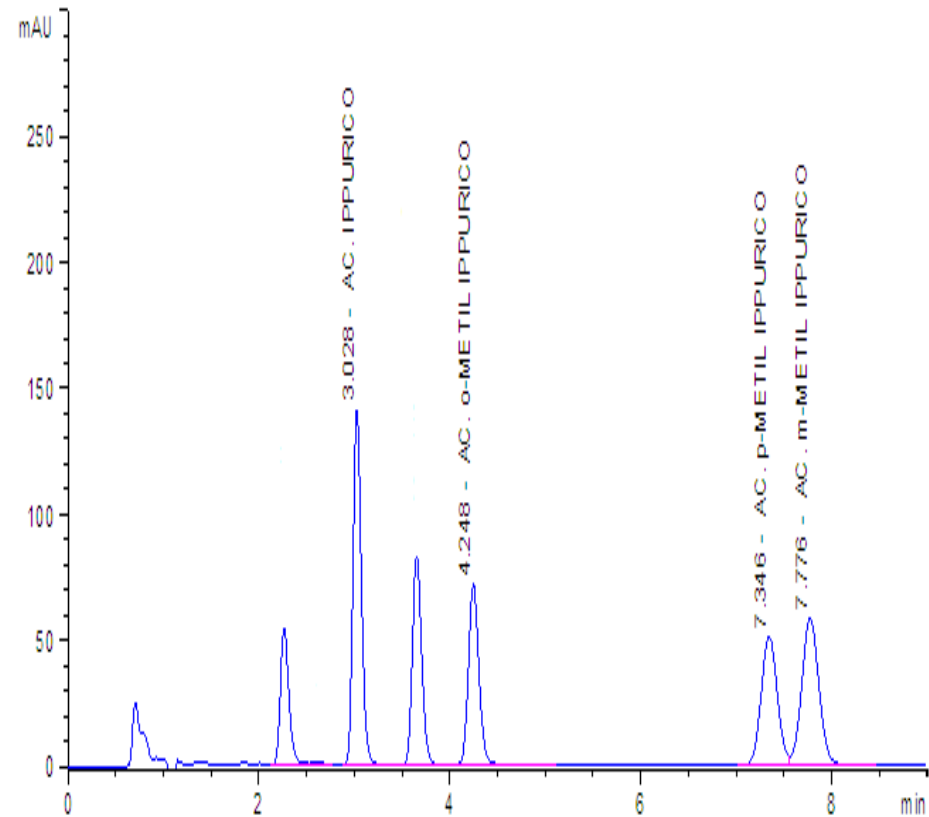


Fig. 6	Controllo liofilo urinario livello 2		
	R.T. 3.02	Acido Ippurico	1869,7 mg/l
	R.T. 4.24	Acido o-Metilippurico	705,4 mg/l
	R.T. 7.34	Acido p-Metilippurico	756,7 mg/l
	R.T. 7.77	Acido m-Metilippurico	745,1 mg/l

ACIDO IPPURICO/ACIDI o-m-p-METILIPPURICI URINARI
(Cromatogrammi di riferimento)

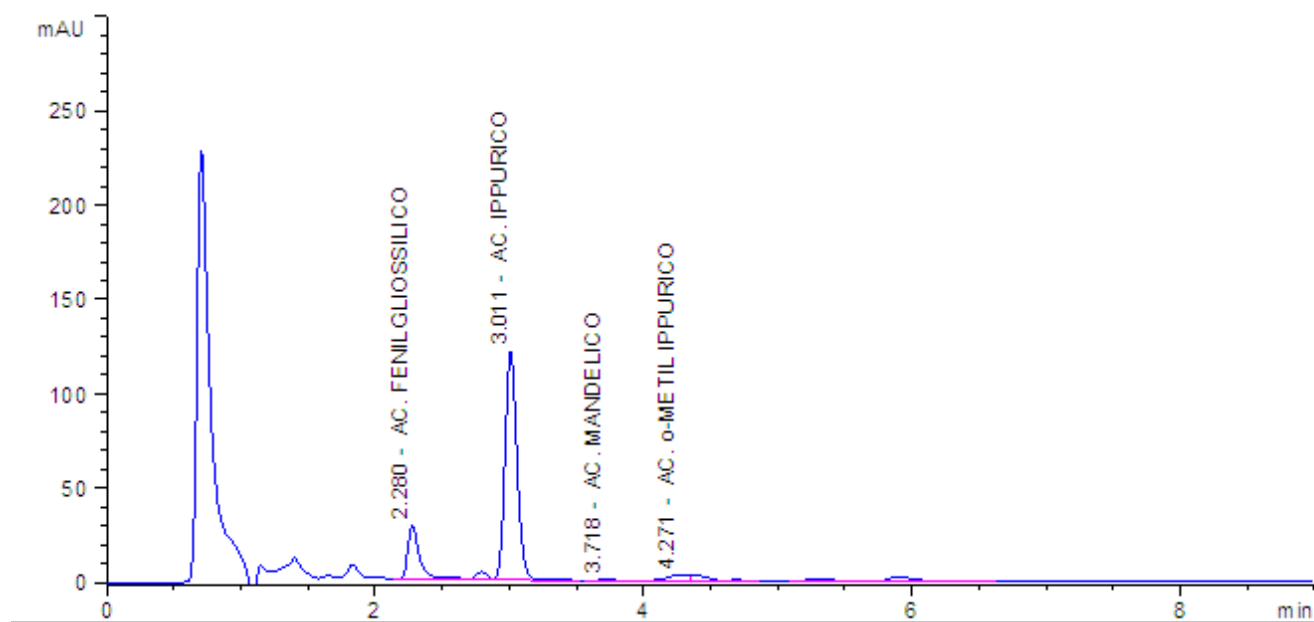


Fig. 7	Campione urinario		
	R.T. 2.28	Acido Fenilgliossilico	187,1 mg/l
	R.T. 3.04	Acido Ippurico	1.420,3 mg/l
	R.T. 3.67	Acido Mandelico	Non rilevabile
	R.T. 4.25	Acido o-Metilippurico	Non rilevabile
	R.T. 7.30	Acido p-Metilippurico	Non rilevabile
	R.T. 7.82	Acido m-Metilippurico	Non rilevabile