

CROSS LINKS URINARI del PIRIDINIO in FLUORIMETRIA – FAST – Codice Z29610

BIOCHIMICA

La **Piridinolina (Pyr)** e la **Deossipiridinolina (D-Pyr)** sono due crosslinks del collagene maturo presenti in molti tessuti connettivi quali l'osso, la cartilagine, i tendini, i legamenti e l'aorta, ma assenti nel collagene della cute. In particolare, la **Pyr** è presente in quantità significative nella cartilagine e nell'osso, mentre la **D-Pyr** è presente prevalentemente nell'osso.

Entrambi i composti vengono escreti con le urine e, poichè l'osso ha un turnover ed una massa molto elevata rispetto agli altri tessuti connettivi nei quali i due crosslinks sono presenti, il pool urinario di piridinoline si può considerare proveniente prevalentemente da esso.

Inoltre, questi composti derivano esclusivamente dalla degradazione del collagene maturo e non dal collagene di nuova formazione e la loro escrezione sembra non essere influenzata dalla dieta. Proprio per questi motivi, il dosaggio delle concentrazioni urinarie della **Pyr** e della **D-Pyr** è stato proposto per la valutazione del riassorbimento osseo e delle patologie ad esso correlate quali l'osteoporosi, l'iperparatiroidismo primario, il morbo di Paget ed anche per il follow-up delle metastasi tumorali ossee.

L'analisi della **Pyr** e della **D-Pyr** sfrutta le proprietà fluorescenti naturali di questi due crosslinks. La metodica prevede l'utilizzo dell'HPLC previo pretrattamento del campione urinario idrolizzato con la tecnica separativa SPE.



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° 005		11/2025
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

Il campione/standard liofilo ricostituito viene idrolizzato a 100 °C per 16 ore oppure per 1 h a 150 °C. L'idrolizzato viene quindi purificato con la tecnica SPE su colonne clean-up monouso e l'eluato iniettato direttamente nel sistema HPLC.

Recupero del Metodo :

>98%

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

Piridinolina 4 pMoli/ml
DeossiPiridinolina 4 pMoli/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

Piridinolina 10 pMoli/ml
DeossiPiridinolina 8 pMoli/ml

Valori di riferimento :

Piridinolina 200 – 620 pMoli/ml nelle 24 ore
DeossiPiridinolina 80 – 320 pMoli/ml nelle 24 ore

Linearità :

Piridinolina 10 - 6.000 pMoli/ml
DeossiPiridinolina 8 - 3.500 pMoli/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Piridinolina:

Ci	Cs
643,4 pMoli/ml	2.364,2 pMoli/ml
13,8%	5,7%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Piridinolina :

Ci	Cs
643,4 pMoli/ml	2.364,2 pMoli/ml
17,7%	10,0%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Piridinolina:

Cl	Cm	Cs
490,1 pMoli/ml	712,213 pMoli/ml	2.617,12 pMoli/ml
8,3%	4,2%	6,3%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Piridinolina:

Cl	Cm	Cs
490,1 pMoli/ml	712,213 pMoli/ml	2.617,12 pMoli/ml
12,7%	7,2%	8,5%

Accuratezza intra serie (errore relativo %) DeossiPiridinolina:

Ci	Cs
90,8 pMoli/ml	313,5 pMoli/ml
14,6%	9,9%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) DeossiPiridinolina :

Ci	Cs
90,8 pMoli/ml	313,5 pMoli/ml
18,5%	8,2%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) DeossiPiridinolina:

Cl	Cm	Cs
54,4 pMoli/ml	85,7 pMoli/ml	334,9 pMoli/ml
10,5%	7,3%	7,6%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) DeossiPiridinolina:

Cl	Cm	Cs
54,4 pMoli/ml	85,7 pMoli/ml	334,9 pMoli/ml
15,7%	7,1%	6,3%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

Piridinolina 0,9985 ± 0,0021
DeossiPiridinolina 0,9999 ± 0,0014

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente (≤ 20 °C). I Calibratori liofilati sono stabili 24 mesi dalla data di preparazione se conservati a -20 °C.

Reagente A – Soluzione di condizionamento, **2 x 200 ml**

Reagente B – Soluzione diluente, **2 x 150 ml**

Reagente C – Soluzione di lavaggio, **3 x 200 ml**

Reagente D – Soluzione eluente, **1 x 120 ml**

Reagente E – Soluzione Standard Esterno, **1 x 5 ml**

Calibratore liofilo urinario, 2 x 5 ml

Codice Z29016
Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

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

Colonne Clean-UP, 100 Pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl.
Detector fluorimetrico $\lambda_{ex}=295\text{ nm}$ $\lambda_{em}=400\text{ nm}$

Modalità per il prelievo :

Campione della raccolta urinaria delle 24 ore.
Il campione è stabile oltre 2 mesi se conservato a -20 °C.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Idrolisi del campione urinario

- In provette da idrolisi pipettare 500 µl di campione urinario e 500 µl di **HCl 37%(acido cloridrico concentrato)**

Al vortex per 20 secondi

- Idrolizzare i campioni per 16 h a 100 °C oppure 1 h a 150 °C. Dopo l'idrolisi lasciare raffreddare i Campioni a Temperatura ambiente.
- Centrifugare a 3000 rpm per 5 minuti.

FASE 2 : Preparazione del campione.

In provette idonee da 10 ml dispensare in sequenza:

	Calibratore	Campione
Reagente B – Sol. Diluente	2,5 ml	2,5ml
Calibratore idrolizzato	0,5 ml	
Campione idrolizzato		0,5 ml

Al vortex per 20 secondi

FASE 3 : Condizionare la colonna SPE con 3,0 ml di **Reagente A – Sol. di Condizionamento**.
Scartare l'eluato senza portare a secco.

FASE 4 : Versare i 3 ml di idrolizzato diluito nella colonna SPE corrispondente.
Scartare l'eluato senza portare a secco.

FASE 5 : Lavare la colonna SPE con 2,5 ml di **Reagente C – Sol. di Lavaggio**.
Scartare l'eluato senza portare a secco e **ripetere l'operazione una seconda volta** sempre con 2,5 ml di **Reagente C – Sol. di Lavaggio**.

FASE 6 : Lavare la colonna SPE con 0,2 ml di H₂O distillata (non fornita nel kit)
Scartare l'eluato e portare a secco.

FASE 7 : Posizionare la colonna SPE su una provetta di raccolta. Pipettare nella colonna 1 ml di **Reagente D – Sol. Eluente** e **raccogliere l'eluato – portare a secco**

FASE 8 : Aggiungere 20 µl di **Reagente E – Sol. Standard Esterno** all'eluato.

Al vortex per 20 secondi

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

INIEZIONE :

Iniettare 10 µl dell'eluato nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

CROSSLINKS DEL PIRIDINIO – Avvertenze

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO 363 - VARIAN

λ_{EX}	295 nm
λ_{EM}	400 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	1-HIGH

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 dei 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 Fluorimetrico 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.

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 : 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	10 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 120 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z29016	Calibratore liofilo in urina per Crosslinks	4 x 5 ml
Z29019	Controllo liofilo in urina per Crosslinks - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 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

CROSSLINKS del PIRIDINIO

(Cromatogrammi di riferimento)

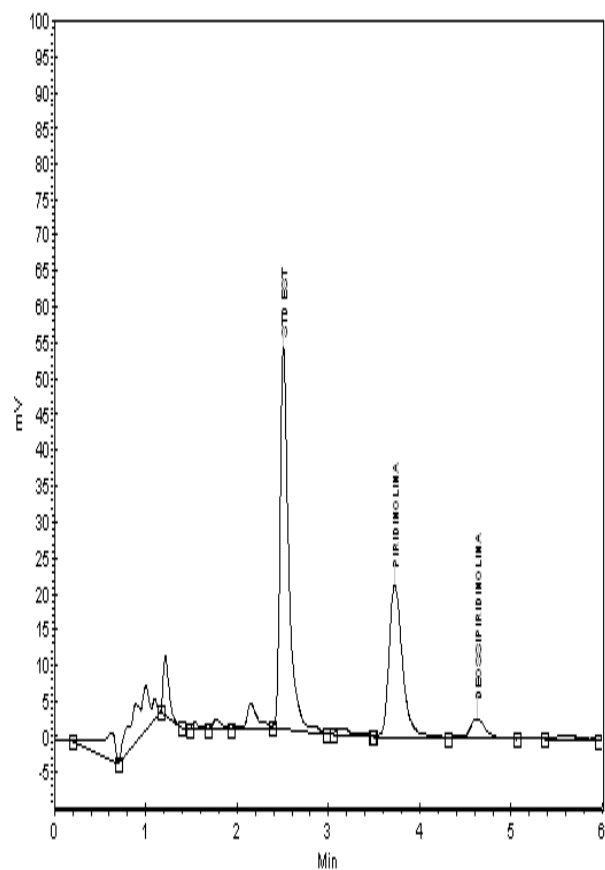


Fig. 1 : *Calibratore liofilo urinario*

R.T. 2.5	Standard Esterno
R.T. 3.7	Piridinolina 1118.2 pMoli/ml
R.T. 4.6	Deossipiridinolina 151.1 pMoli/ml

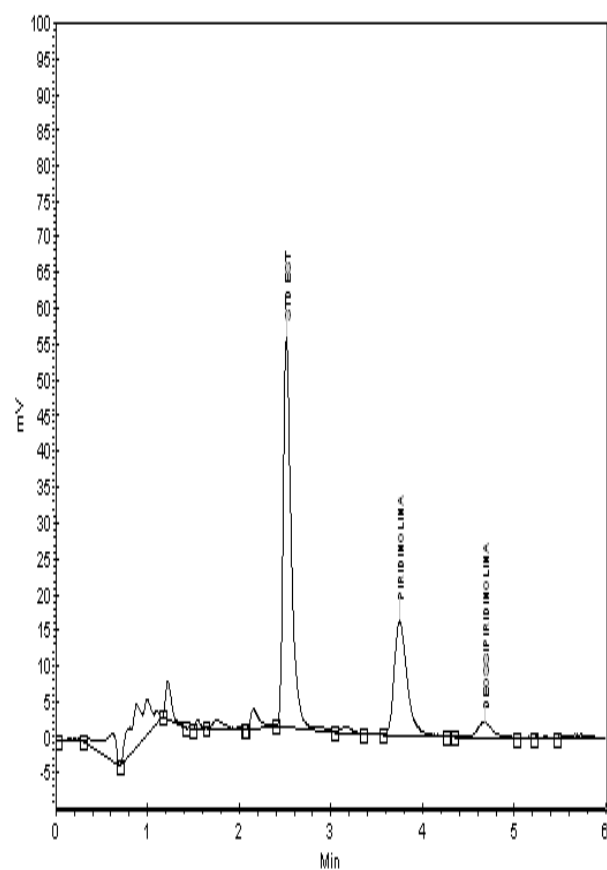


Fig. 2 : *Controllo liofilo urinario livello 1*

R.T. 2.5	Standard Esterno
R.T. 3.7	Piridinolina 482 pMoli/ml
R.T. 4.6	Deossipiridinolina 110 pMoli/ml

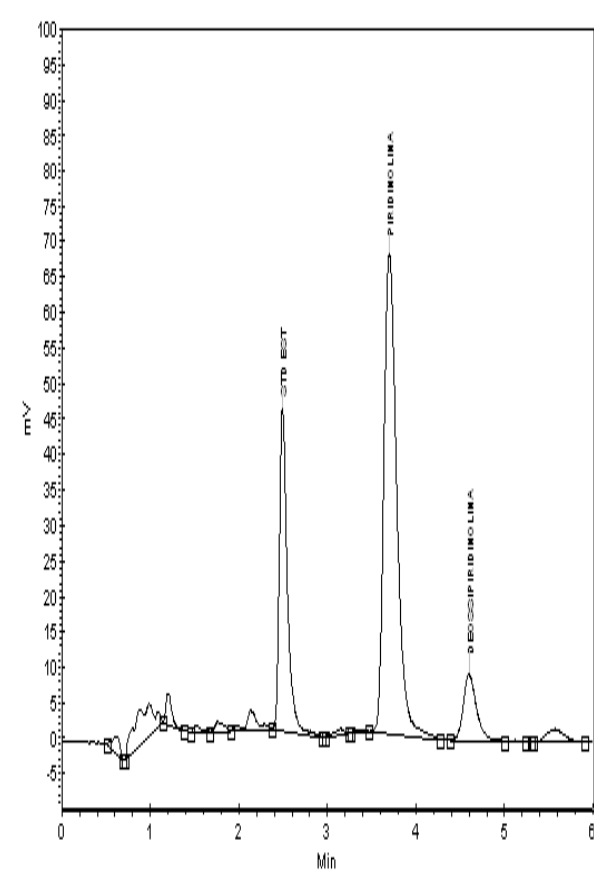


Fig. 3 : *Controllo liofilo urinario livello 2*

R.T. 2.5	Standard Esterno
R.T. 3.7	Piridinolina 2364.2 pMoli/ml
R.T. 4.6	Deossipiridinolina 313.5 pMoli/ml