

BIOCHIMICA

1-HYDROXYPYRENE (1-OH-Pyr) è un prodotto del metabolismo del PYRENE, componente della famiglia degli Idrocarburi Policiclici aromatici (IPA). Il termine generico IPA rappresenta più di 200 composti di condensazione, a molti dei quali vengono riconosciute elevate capacità carcinogene e mutagene.

L'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato il benzo(a)pyrene, il benzo(a)antracene e il dibenzo(a,h)antracene come sostanze di gruppo 2A (probabile carcinogeno umano).

Il Pyrene è un idrocarburo che si ritrova sia sotto forma di vapore che di particolato e può quindi essere assorbito sia per via respiratoria che per via cutanea. Inoltre è sempre presente in quantità rilevanti nelle miscele di IPA.

Questa ed altre ragioni hanno fatto sì che sia stato scelto da molti ricercatori come tracciante dell'inquinamento da IPA insieme al suo metabolita 1- Hydroxypyrene.

L'1 – Hydroxypyrene viene escreto nelle urine coniugato con l'acido glucuronico e con il solfato; per liberarlo e renderlo disponibile all'analisi occorre quindi idrolizzare il campione con la β -glucuronidasi/arilsulfatasi per 16 h a 37 °C a pH=5,0.

L'escrezione urinaria dell'1-OH-Pyr viene assunta come possibile biomarker di esposizione al Pyrene e agli IPA.

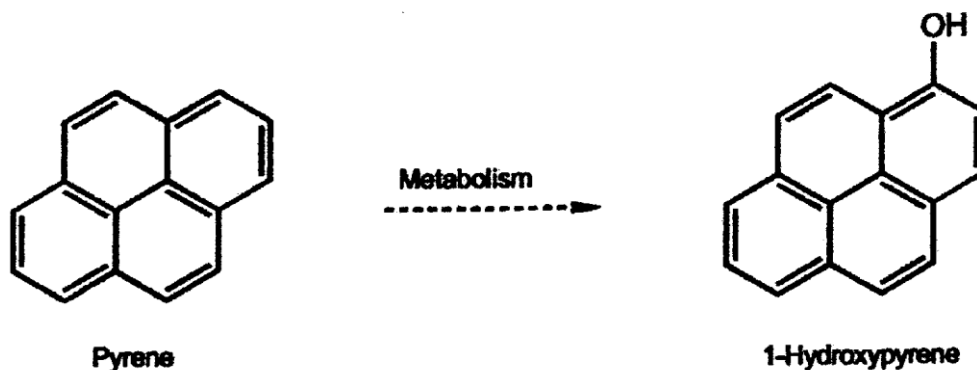


Fig. 1 : Metabolismo dell' 1-Idrossipirene

 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° 003	1-Idrossipirene urinario in Fluorimetria - FAST	06/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L'1-IDROSSIPIRENE, dopo idrolisi enzimatica a pH=5,0 viene purificato su colonna di clean-up e l'eluato viene iniettato nel sistema HPLC.

Recupero del Metodo : 99,1%

Sensibilità del Metodo (LLOD) : 100 ng/l

Minima Concentrazione analizzabile (LLOQ) : 300 ng/l

Valori accettabili in soggetti non esposti : < 1.400 ng/g creatinina
Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2003;25:1

Valori di riferimento : < 2.000 ng/g creatinina
< 2.500 ng/l
Riferimento: ACGIH 2020

Range dinamico del metodo : 300 – 5.000 ng/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

C₁	C₂
1100 ng/l	1500 ng/l
1,2%	3,4%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

C₁	C₂
1100 ng/l	1500 ng/l
1,5%	2,8%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C_{LLOQ}	C_{MEDIUM}	C_{SUP}
300 ng/l	2000 ng/l	3000 ng/l
1,0%	0,8%	1,8%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C_{LLOQ}	C_{MEDIUM}	C_{SUP}
300 ng/l	2000 ng/l	3000 ng/l
3,1%	1,2%	1,8%

Coefficiente di Correlazione R² + Dev Std: 0,9951 ± 0,0004

<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 $^{\circ}\text{C}$.
Reagente A – Soluzione Tampone x Idrolisi, 1 x 250 ml	
Reagente B – Enzima di Idrolisi, 25 x 1,0 ml	Da ricostituire con 9,0 ml di Reagente A. Quando ricostituito, l'enzima è stabile 1 anno a 2–8 $^{\circ}\text{C}$.
Reagente C – Soluzione di Lavaggio, 2 x 500 ml	
Reagente E – Soluzione Eluente, 1 x 250 ml	
Reagente F – Soluzione Standard Interno, 1 x 25 ml	<u>Stoccare a 2-8 $^{\circ}\text{C}$</u>
Reagente G – Soluzione Test, 1 x 5 ml	<u>Stoccare a 2-8 $^{\circ}\text{C}$</u>
Calibratore Liofilo , 10 x 10 ml	<u>Codice Z38016</u>
Reagente M – Fase Mobile, 15 x 500 ml	<u>Confezionato a parte – vedi scheda tecnica</u>
Colonne di clean-up , 500 pz	

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 μl
 Detector Fluorimetrico $\lambda_{\text{Ex}} = 242\text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} = 388\text{ nm}$
 Registratore di cromatogrammi

Modalità per il prelievo :

Urine inizio turno *oppure* Urine fine turno *oppure*
 Urine fine settimana e fine turno.
 Non occorre alcun conservante
 Far pervenire al Laboratorio una provetta con 10 ml di campione

Fase preanalitica :

Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Se non si analizza subito, stoccare il campione in frigorifero.
 Stabile 2 settimane a 2–8 $^{\circ}\text{C}$.
 Stabile circa 2 mesi a – 20 $^{\circ}\text{C}$.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta pipettare :

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente G** - Soluzione Test
- 50 µl di **Reagente F** - Soluzione Standard Interno

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 10 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dell'1-Idrossipirene 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.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Ricostituzione dell'enzima

Il **Reagente B** – Enzima di Idrolisi va ricostituito con 9,0 ml di **Reagente A** – Soluzione Tampone per Idrolisi. Quando ricostituito, l'enzima è stabile 1 anno a 2–8 °C.

FASE 2 : Idrolisi dei campioni

In provette in pyrex da 10 ml idonee dispensare in sequenza.

	Calibratore	Campione
Calibratore Liofilo	1,0 ml	
Campione		1,0 ml
Reagente B – Enzima di idrolisi (ricostituito)	400 µl	400 µl

Controllare che il pH sia $\cong$ 5,0 – Eventualmente correggerlo

Al vortex per 20 secondi

Porre in stufa a 60 °C per 3 ore

FASE 3 : Caricamento dei Campioni, Calibratore e Controlli nelle rispettive colonne di clean-up:

- Aggiungere ad ogni campione idrolizzato 50 µl di **Reagente F** – Soluzione Standard interno
- Versare 1450 µl di campione nella colonna di clean-up *Scartare l'eluato.*

FASE 4 : Lavaggio delle colonne di clean-up:

- Versare nelle colonne 2,0 ml di **Reagente C** – Sol. di Lavaggio *Scartare l'eluato*

FASE 5 : Eluizione:

- Eluire con 500 µl di **Reagente E** – Soluzione Eluente *Raccogliere l'eluato*

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

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

1-IDROSSIPIRENE - Avvertenze

REAGENTE G : SOLUZIONE TEST

1 – IDROSSIPIRENE	circa 54.000 ng/l
--------------------------	-------------------

Fattori di conversione: 1,0 μ mol = 218,25 μ g di Idrossipirene / 1,0 mg = 4,58 μ mol di Idrossipirene

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{Ex}	242 nm
λ_{Em}	388 nm
GAIN	1 x 100
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μ). Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (50 : 50 v / v) a pH=3** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile per 30 minuti al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. **NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.** Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector Fluorimetrico.
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 (50 : 50 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto per 30 minuti e scaricare. **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 (50 : 50 v / v)**

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

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

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,5 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 130 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z38016	Calibratore urinario per 1-Idrossipirene	4 x 10 ml
Z38017	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici - Livello 1	5 x 10 ml
Z38018	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici - Livello 2	5 x 10 ml
Z38019	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 10 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
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



1 – IDROSSIPIRENE (Cromatogrammi di Riferimento)

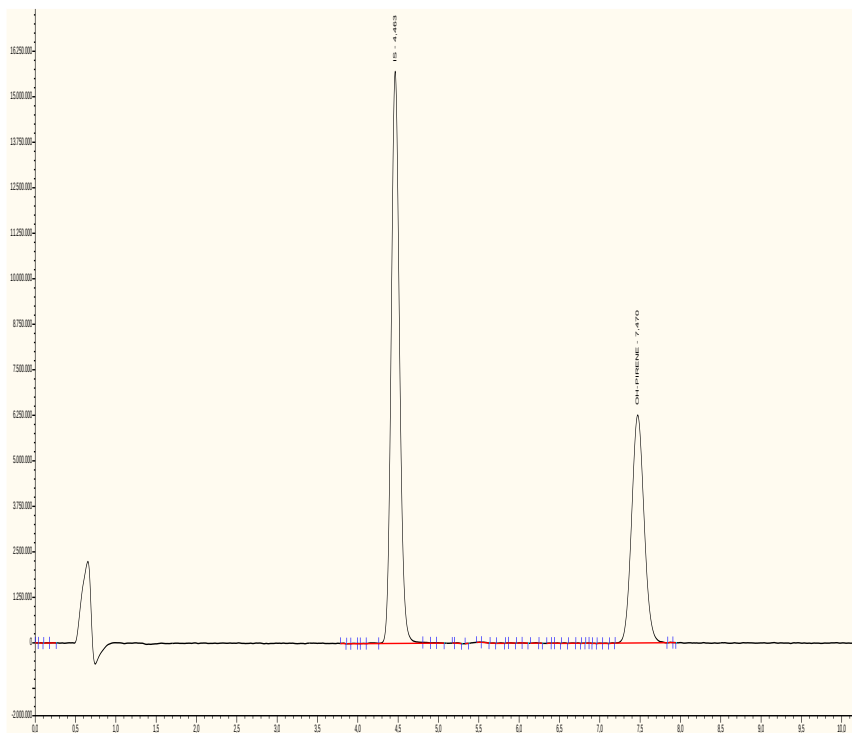


Fig. 2	Soluzione Test
	R.T. 4.46 Standard Interno
	R.T. 7.47 Idrossipirene

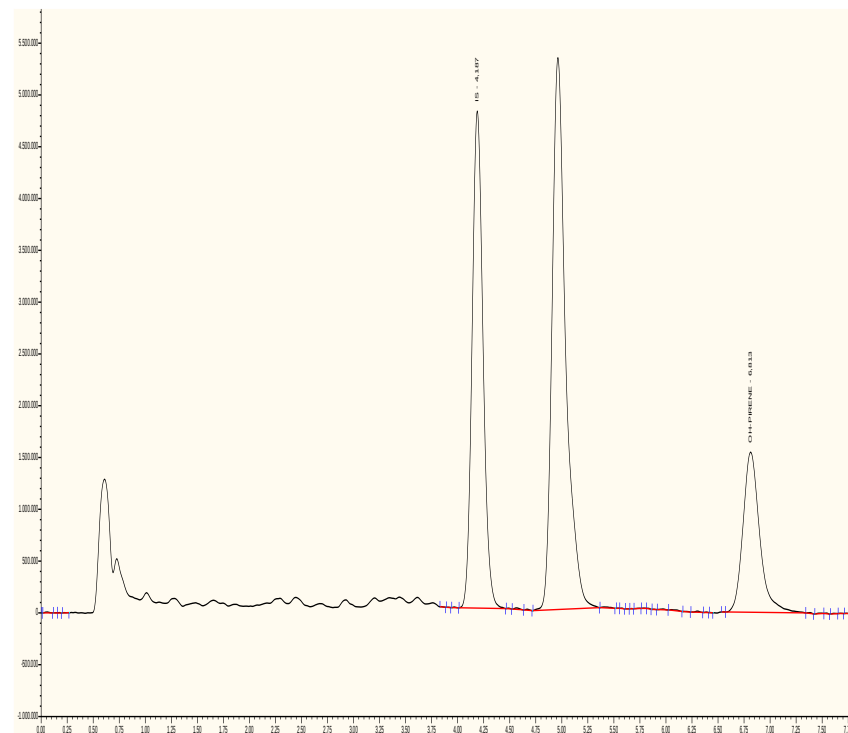


Fig. 3	Calibratore liofilo
	R.T. 4.18 Standard Interno
	R.T. 6.81 Idrossipirene

1 – IDROSSIPIRENE (Cromatogrammi di Riferimento)

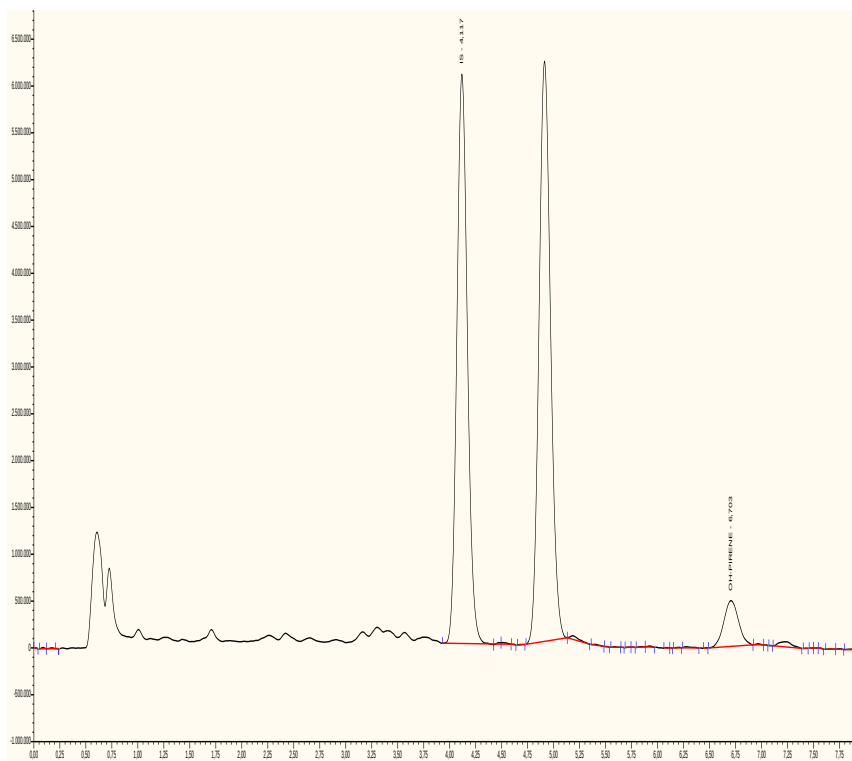


Fig. 4	Controllo lofilo basso
	R.T. 4.11 Standard interno
	R.T. 6.70 Idrossipirene

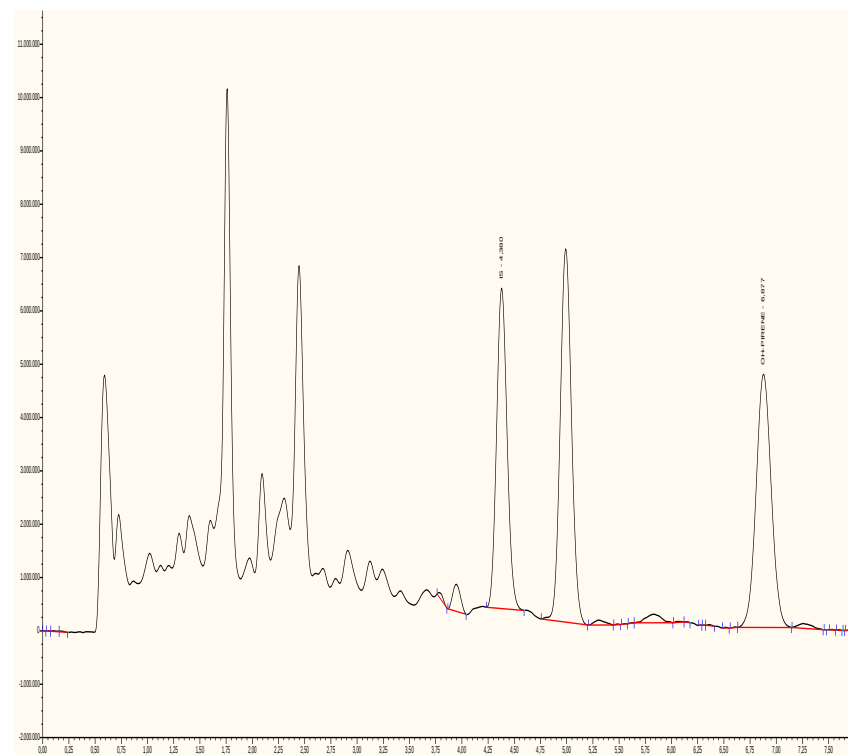


Fig. 5	Campione urinario
	R.T. 4.38 Standard interno
	R.T. 6.87 Idrossipirene 1500 ng/l