o-CRESOLO e FENOLO URINARI in FLUORIMETRIA - FAST – Codice Z55310

BIOCHIMICA

Il FENOLO viene usato in numerose sintesi organiche di interesse industriale e come disinfettante.
E' tossico di per sé e viene assorbito attraverso la cute, l'apparato respiratorio e, in casi accidentali, attraverso l'apparato digerente.
Nell'organismo il fenolo è in parte coniugato con l'acido solforico e l'acido glucuronico. Non c'è bioaccumulo, viene escreto con le urine.[1]

TOSSICITÀ
Intossicazione acuta: si verifica per ingestione accidentale e porta a convulsioni e rapido collasso. Il fenolo è irritante per le mucose, gli occhi e la cute.
Intossicazione cronica: dolori esofagei, cefalee, vertigini, anoressia e acidosi, nausea, vomito e diarrea. [1]

La classificazione della cancerogenicità del Fenolo è la seguente: [2]
EPA-I;D, IARC-3, MAK-3B, TLV-A4

Il presente metodo consente di determinare la concentrazione di Fenolo nelle urine, previa idrolisi.

L'o-CRESOLO è un metabolita urinario del Toluene, sostanza che viene impiegata nella produzione di materiali d'uso corrente (colle, vernici, lacche, inchiostri ecc.) ed è presente anche come microinquinante ambientale: questo fa si che tutta la popolazione sia esposta a modeste concentrazioni di Toluene. Inoltre una sorgente indoor importante di Toluene è costituita dal fumo di tabacco.[3]

Il toluene viene assorbito attraverso i polmoni e più lentamente attraverso la cute; nell'organismo si ritrova in primo luogo nel sangue, successivamente si deposita nel tessuto adiposo. Il 20 % della dose assorbita viene eliminato tal quale dall'apparato respiratorio, l'80% viene biotrasformato: i principali metaboliti sono l'acido ippurico, l'o-cresolo e l'acido benzoico. [1]

TOSSICITÀ
Esposizione acuta: irritazione delle prime vie aeree e depressione del SNC.
Esposizione cronica: intolleranza all'alcool, cefalea e disturbi del ritmo sonno-veglia; sintomi a livello epatico (epatomegalia) e a livello renale (nefrotossicità). [1]

L’escrezione urinaria di o-CRESOLO è molto bassa: la velocità di eliminazione è di circa 1,08 mg/h e notevole è la variabilità interindividuale. Sono state riscontrate concentrazioni medie di 38 µg/g creatinina nei maschi e 25 µg/g creatinina nelle femmine.[3]

Il dosaggio a livello urinario è indice di esposizione al Toluene.

La classificazione della cancerogenicità del Fenolo è la seguente: [2]
EPA-C, MAK-3A, TLV-A4
Il presente metodo consente di determinare la concentrazione di o-Cresolo nelle urine, previa idrolisi.

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.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :
L'o-Cresolo ed il Fenolo, dopo idrolisi a 95 °C per 30 minuti, vengono prima tamponati e poi diluiti con opportuni solventi; la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo : >98%

Sensibilità analitica (LLOD) : 0,013 mg/l o-Cresolo
0,01 mg/l Fenolo

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) : 0,04 mg/l o-Cresolo
0,03 mg/l Fenolo

Linearità del Metodo : o-Cresolo 0,04 – 10 mg/l
Fenolo 0,03 – 500 mg/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) o-Cresolo:

Ci	Cs
0,1 mg/l	0,6 mg/l
6,4%	3,9%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) o-Cresolo:

Ci	Cs
0,1 mg/l	0,6 mg/l
7,4%	5,2%

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

C LLOQ	Cm	Cs
0,04 mg/l	0,3 mg/l	1 mg/l
8,7%	3,6%	2,9%

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

C LLOQ	Cm	Cs
0,04 mg/l	0,3 mg/l	1 mg/l
10,8%	6,4%	3,4%

Coefficiente di correlazione R^2 + Dev Std 0,9958 ± 0,0015 o-Cresolo

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Fenolo :

Ci	Cs
10 mg/l	30 mg/l
3,8%	1,0%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Fenolo:

Ci	Cs
10 mg/l	30 mg/l
6,4%	3,5%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Fenolo:

C LLOQ	Cm	Cs
0,03 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
8,5%	5,9%	3,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Fenolo:

C LLOQ	Cm	Cs
0,03 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
9,8%	6,6%	4,4%

Coefficiente di correlazione R^2 + Dev Std 0,9955 ± 0,0020 Fenolo

Indici biologici di Esposizione – I.B.E. o-Cresolo urinario: 0,3 mg/g creatinina
Fenolo urinario: 250 mg/g creatinina
ACGIH 2020

Contenuto della confezione :	Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente (≤ 20 °C). Eccetto il **Reagente C** per il quale si rimanda di vedere le Avvertenze.
Reagente B – Soluzione Tampone**, 1 x 90 ml**	
Reagente C – Soluzione Test, **1 x 2 ml**	**Vedere Avvertenze**
Reagente D – Soluzione Standard Interno, **1 x 1 ml**	
Calibratore liofilo, 1 x 1 ml	**Codice Z55016** **Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Reagente M – Fase Mobile, **3 x 500 ml**	
Dotazione strumentale minima richiesta :	Strumento HPLC isocratico con loop da 5 µl. Detector Fluorimetrico λ_{EX} **=270 nm** λ_{EM} **=300 nm** Registratore di cromatogrammi
Dotazione opzionale :	Autocampionatore. Computer gestionale
Modalità di raccolta delle urine :[1]	Per Fenolo: Momento di campionamento: fine turno. Contenitore: provette in polietilene o polipropilene Conservante: non necessario Modalità di conservazione: a 4°C fino a 7 giorni Per o-Cresolo: Momento di campionamento: fine turno (ACGIH); dopo un periodo prolungato di esposizione, alla fine della esposizione o del turno di lavoro (DFG). Contenitore: provette in polietilene. Conservante: non necessario. Modalità di conservazione: a 4°C fino a 7 giorni

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test.

In una provetta pipettare :

- 980 µl di Acqua grado HPLC
- 10 µl di **Reagente C** – Sol. Test
- 10 µl di **Reagente D** – Sol. Standard Interno

Agitare 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. 1. 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

Dispensare in provette in pyrex con tappo a vite in teflon:

	Calibratore	**Campione**
Calibratore	100 µl	
Campione		100 µl
HCl37%(acido cloridrico concentrato)	150 µl	150 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 2 :Porre la serie di provette in stufa a 95 °C per 30 minuti.

Lasciar raffreddare a temperatura ambiente

FASE 3 : Aprire le provette e aggiungere 850 µl del **Reagente B** – Soluzione Tampone + 10 µl del **Reagente D** – Soluzione Standard Interno

Agitare al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

Nota: Per la determinazione del Fenolo, in presenza di un picco in saturazione sul controllo L2, è possibile diluire ulteriormente la soluzione tamponata o ancora meglio, diminuire il volume di iniezione

INIEZIONE :

- Iniettare 1 - 5 µl della soluzione nel Cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

o-CRESOLO e FENOLO URINARI - *Avvertenze*

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST

o-CRESOLO **FENOLO**	15,0 mg/l 20,0 mg/l
Conservazione: stoccare a 2-8 °C	

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO 363 – VARIAN

λ_{EX}	270 nm
λ_{EM}	300 nm
SENSIBILITA'	2 - MEDIUM

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo POROSHELL 120 PFP (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 PFP (50 x 4,6 mm, 2,7 µ).
Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di **H2O : Acetonitrile (20 : 80 v / v)** al flusso di 1.4 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1.4 ml/minuto e scaricare i primi 28 ml. Condizionare ulteriormente la colonna per 10 minuti anche a ricircolo di fase. 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 una soluzione di **H2O : Acetonitrile (20 : 80 v / v)** al flusso di 1.4 ml/minuto per 20 minuti e scaricare. Quando la colonna verrà usata di nuovo far flussare 10 ml di **H2O : Acetonitrile (80 : 20 v / v)** per 10 minuti ad un flusso di 1.0 ml/min 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 (20 : 80 v / v)**

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

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

PARAMETRI HPLC

LOOP	5 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,4 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 150 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z55016	Calibratore urinario per o-Cresolo/Fenolo	4 x 1 ml
Z55019	Controllo urinario per o-Cresolo/Fenolo – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z699975408	Colonna Analitica Poroshell 120-PFP (50 x 4,6mm –2,7 um)	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

BIBLIOGRAFIA:

1- G Ital Med Lav Erg 2002; 24:3 Supp
2- Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene, ACGIH 2012
3- G.B. Bartolucci, P. Bavazzano, A. Perico, L. Perbellini. Valori di riferimento di solventi e metaboliti in campioni biologici. G Ital Med Lav Erg 2003; 25:1, 74-82

4- Jen, Tsai. Determination of phenol in urine by HPLC with on-line precolumn enzymatic hydrolysis of the conjugate. J chromatogr B Biomed Appl. 1994 Aug 5;658(1):87-92.
5- Lee, Ong, Shi, Ong. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using HPLC with fluorimetric detection. J chromatogr 1993 Sep 22;619(2):259-66.

6- Schlatter, Astier. Rapid determination of o- and p-cresol isomers in urine from workers exposed to toluene by HPLC using chromatography using a graphitised carbon column. Biomed Chromatogr 1995 Nov-Dec; 9(6):302-4.
7- Inoue, Kanno, Kasai, Ukai, Okamoto, Ikeda. Benzymercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary, marker of occupational expure to toluene. Toxicol lett. 2004 Mar 1;147(2):177-86.

8- Brega, Grandini, Amaglio, Pafumi. Determiantion of phenol, m-, o- and p-cresol, p-aminophenol and p-nitrophenol in urine by HPLC. J Chromatogr 1990 Dec 28;535 (1-2):311-6.
9- Tsuruta, Watanabe, Inoue. Fluorometric determination of phenol and p-cresol in urine by precolumn HPLC using 4-(N-phthalimidinyl) benzenesulfonyl chloride. Anal Biochem 1996 Dec 1;243 (1): 86-91.
10- Nakashima, Kinoshita, Wada, Kuroda, Baeyens. HPLC with fluorescence detection of urinary phenol, cresols and xylenols using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a fluorescence labelling reagent. Analyst. 1998 Nov; 123(11):2281-4.

o-CRESOLO e FENOLO URINARI

(Cromatogrammi di Riferimento)

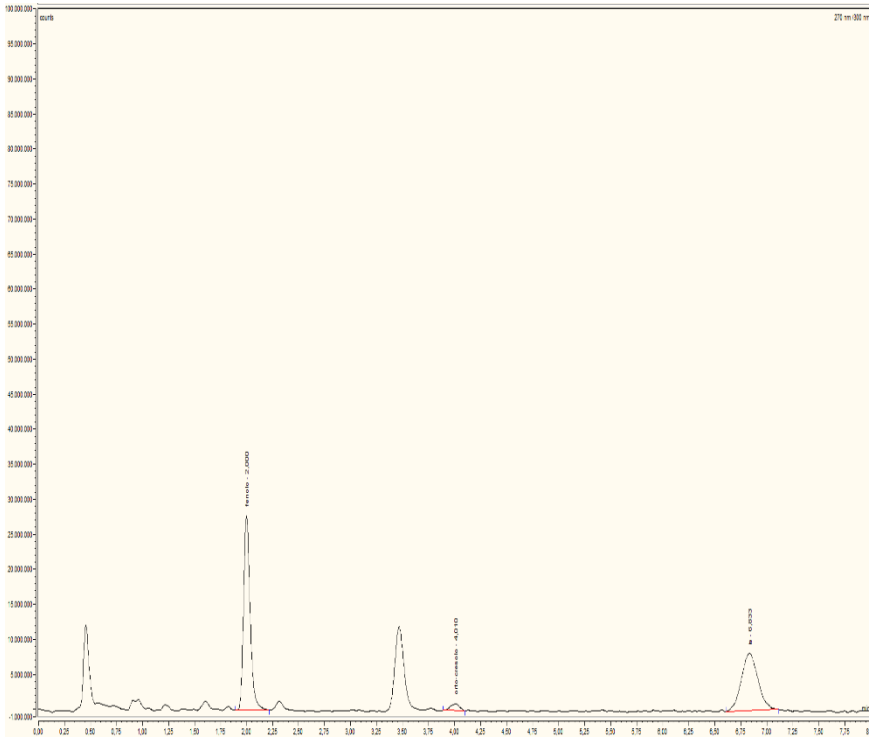

Fig. 1	***Calibratore liofilo***
	R.T. 2.0 Fenolo 7,6 mg/l
	R.T. 4.0 o-Cresolo 0,5 mg/l
	R.T. 6.8 Standard Interno

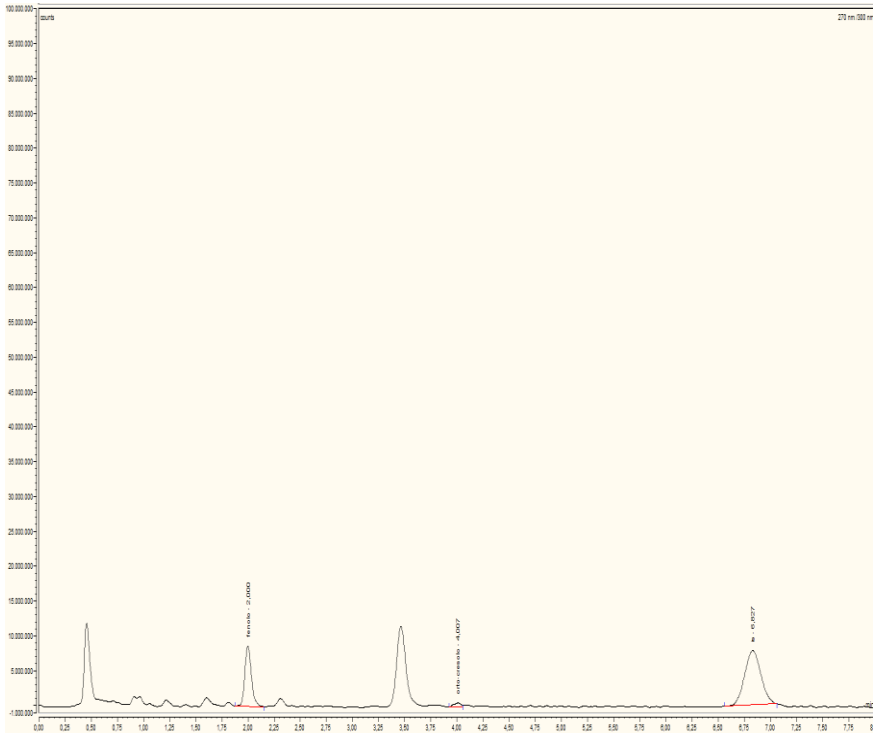

Fig. 2	***Controllo livello 1***
	R.T. 2.0 Fenolo 2,5 mg/l
	R.T. 4.0 o-Cresolo 0,18 mg/l
	R.T. 6.8 Standard Interno

o-CRESOLO e FENOLO URINARI

(Cromatogrammi di Riferimento)

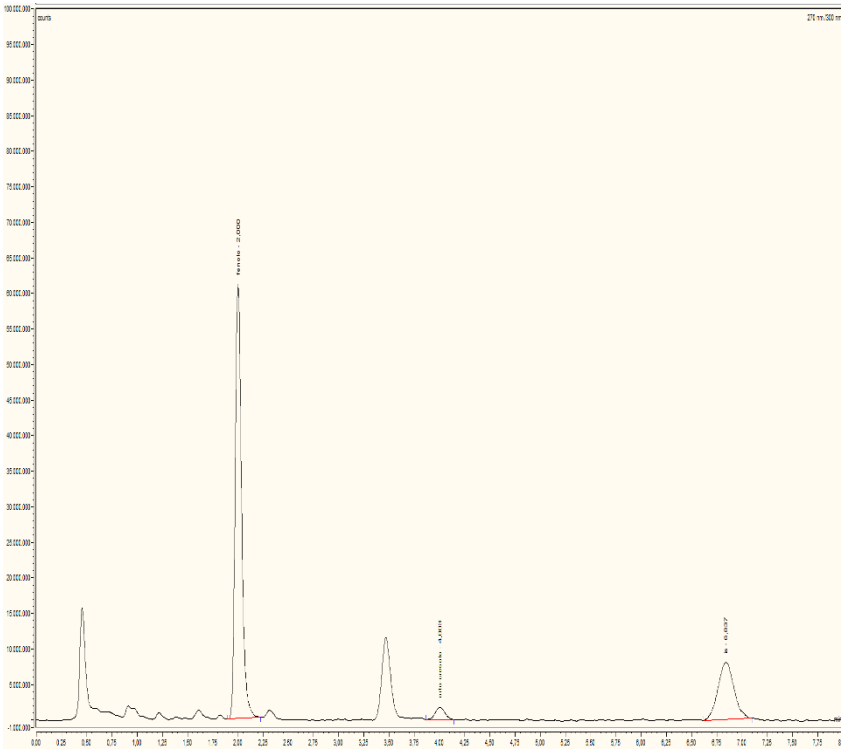

Fig. 3	***Controllo Livello 2***
	R.T. 2.0 Fenolo 16,4 mg/l
	R.T. 4.0 o-Cresolo 1,0 mg/l
	R.T. 6.8 Standard Interno