

VMA, 5-HIAA e HVA URINARI IN LC/MS

Cod. LC14610





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.



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

N° 002	Trittico urinario in LC/MS	06/2024
--------	----------------------------	---------

INTRODUZIONE

METABOLISMO DELLE CATECOLAMINE BIOGENE E FORMAZIONE DEI RISPETTIVI METABOLITI

Le catecolamine sono composti organici diidrossilati caratterizzati da un anello fenolico di tipo catecolico (diidrossibenzene).

I membri più importanti di questa famiglia sono: **ADRENALINA, NORADRENALINA, DOPAMINA**.

La sintesi delle catecolamine avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche che utilizzano come substrato iniziale l'aminoacido aromatico **L-TIROSINA** (fig.1) e tale formazione ha luogo nelle cellule cromaffini della midollare surrenale e dei neuroni simpatici.

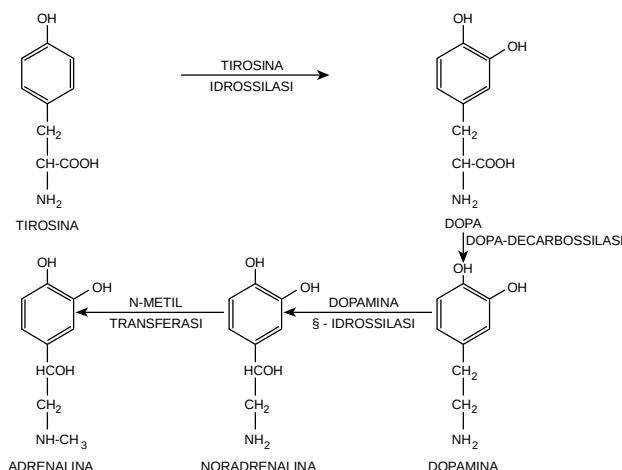


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

CATABOLISMO

Il catabolismo delle monoamine è in parte neuronale ed avviene nei mitocondri ad opera delle MonoAminoOssidasi (MAO) e in parte extraneuronale per le catecolamine, ad opera della CatecolaminaOrtoMetiltransferasi (COMT).

In particolare:

- dalla **DOPAMINA** per azione delle MAO si ha l'Acido Diidrossifenilacetico (DOPAC) il quale per azione della COMT viene trasformato in Acido OMOVANILLICO (HVA).
- dalla **NORADRENALINA** e dall'**ADRENALINA** si origina invece per azione delle MAO, l'aldeide 3,4-Diidrossimandelica da cui derivano successivamente il 3,4-Diidrossifenilglicole (DHPG) e il 3-Metossi-4-Iidrossifenilglicole (MHPG) .
- esiste alternativamente un'altra via metabolica che le trasforma in l'Acido 3,4-Diidrossimandelico da cui per azione della COMT si ha la sintesi di Acido Vanilmandelico (VMA)

L'Acido Omovanillico è il principale catabolita della **DOPAMINA** mentre l'Acido Vanilmandelico rappresenta il principale catabolita di **NORADRENALINA** e di **ADRENALINA**. (fig. 2)

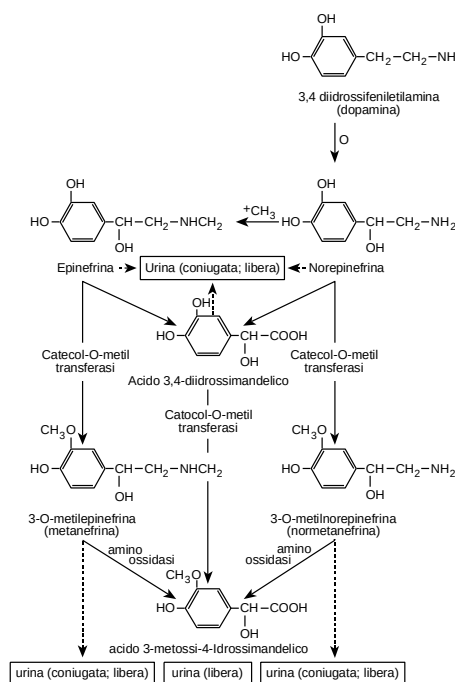


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

PATOLOGIA

La patologia specifica è rappresentata da: FEOCROMOCITOMA, PARAGANGLIOMA, NEUROBLASTOMA. Il FEOCROMOCITOMA è un tumore che spesso si manifesta in soggetti caratterizzati da forte ipertensione (1/1000 soggetti ipertesi), di non elevata malignità (< 5%) e si riscontra nel 90% dei casi in sede surrenalica e nel 10% in sede extrasurrenalica dove prende il nome di PARAGANGLIOMA.

Le sedi extrasurrenaliche più frequenti sono l'organo di Zuckerkandle, gli altri paragangli addominali e la vescica.

Può essere unico nel 90% dei casi e multiplo nel 10%; inoltre nel 90% dei casi è di tipo occasionale e su base familiare nel restante 10%.

Talvolta coinvolge entrambe le surreni (bilaterale) e spesso è associato a carcinoma midollare tiroideo (adenomatosi endocrina multipla di tipo II).

La malignità si riscontra nel 10% dei casi.

Il NEUROBLASTOMA deriva dai simpatogoni provenienti dalla cresta neurale, dopo trasformazione in neuroblasti. Si tratta di tumori immaturi e maligni, localizzati nella midollare o nei gangli simpatici. Producono Catecolamine e loro metaboliti; caratteristicamente si rileva un aumento di DOPAMINA e naturalmente di Acido Omovanillico.

Mentre il sospetto clinico è soprattutto anamnestico, la conferma è solo laboratoristica, mediante l'accertamento di aumentati livelli di catecolamine e/o dei loro metaboliti nel plasma e/o nelle urine. La determinazione delle Catecolamine nel plasma assume particolare rilevanza sul prelievo effettuato in corso di crisi.

CARATTERISTICHE DEL KIT

PRINCIPIO DEL METODO			
Il campione urinario viene diluito e iniettato in LC-MS/MS.			
RECUPERO DEL METODO:	52,8 – 84,4 %		
SENSIBILITÀ DEL METODO (LLOD):	Acido Vanilmandelico	0,008 mg/L	
	Acido 5-Idrossiindolacetico	0,01 mg/L	
	Acido Omovanillico	0,03 mg/L	
MINIMA CONCENTRAZIONE ANALIZZABILE (LLOQ):	Acido Vanilmandelico	0,02 mg/L	
	Acido 5-Idrossiindolacetico	0,04 mg/L	
	Acido Omovanillico	0,1 mg/L	
LINEARITÀ DEL METODO:	Acido Vanilmandelico	0,02 - 250 mg/L	
	Acido 5-Idrossiindolacetico	0,04 - 250 mg/L	
	Acido Omovanillico	0,1 - 250 mg/L	
VALORI DI NORMALITÀ NELLE URINE DELLE 24 H:	Acido Vanilmandelico	1,8 – 6,7 mg/24 h	
	Acido 5-Idrossiindolacetico	0,5 – 8,2 mg/24 h	
	Acido Omovanillico	0,5 – 6,2 mg/24 h	
<u>Accuratezza intra serie (errore relativo %)</u> <u>Acido Vanilmandelico:</u>	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	8,2 mg/l	
	11,79%	5,19%	
<u>Accuratezza inter serie (errore relativo %)</u> <u>Acido Vanilmandelico:</u>	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	8,2 mg/l	
	10,61%	4,75%	
<u>Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido Vanilmandelico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,02 mg/l	1,8 mg/l	13,9 mg/l
	2,17%	4,32%	2,56%
<u>Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido Vanilmandelico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,02 mg/l	1,8 mg/l	13,9 mg/l
	8,32%	5,86%	6,05%
<u>Accuratezza intra serie (errore relativo %)</u> <u>Acido 5-Idrossiindolacetico:</u>	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	9,8 mg/l	
	7,48%	4,40%	
<u>Accuratezza inter serie (errore relativo %)</u> <u>Acido 5-Idrossiindolacetico:</u>	Ci	Cs	
	0,4 mg/l	9,8 mg/l	
	5,06%	3,47%	
<u>Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %)</u> <u>Acido 5-Idrossiindolacetico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,04 mg/l	1,6 mg/l	13,5 mg/l
	7,97%	2,24%	0,43%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) <u>Acido 5-Idrossiindolacetico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,04 mg/l	1,6 mg/l	13,5 mg/l
	5,37%	4,98%	3,11%
Accuratezza intra serie (errore relativo %) <u>Acido Omovanillico:</u>	Ci	Cs	
	1,0 mg/l	5,3 mg/l	
	7,12%	9,38%	
Accuratezza inter serie (errore relativo %) <u>Acido Omovanillico:</u>	Ci	Cs	
	1,0 mg/l	5,3 mg/l	
	8,25%	7,08%	
Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) <u>Acido Omovanillico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,1 mg/l	2,6 mg/l	14,4 mg/l
	7,97%	2,64%	1,21%
Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) <u>Acido Omovanillico:</u>	C LLOQ	Cm	CUP
	0,1 mg/l	2,6 mg/l	14,4 mg/l
	6,36%	3,53%	1,71%
Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std:	0,9974 ± 0,0003 Acido Vanilmandelico 0,9970 ± 0,0007 Acido 5-Idrossiindolacetico 0,9981 ± 0,0013 Acido Omovanillico		

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE (100 TEST)

Reagente A – Soluzione Standard Interno	1 x 2 ml	Conservare a -20 °C
Reagente B – Soluzione Diluente	1 x 20 ml	
Calibratore liofilo urinario – Livello 0	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 1	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 2	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 3	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 4	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 5	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Calibratore liofilo urinario – Livello 6	2 x 1 ml	Codice LC77016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)
Reagente M1 – Fase Mobile M1	1 x 500 ml	
Reagente M2 – Fase Mobile M2	2 x 500 ml	

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C, eccetto il Reagente A che va conservato a -20 °C.
 Per quanto riguarda la modalità di conservazione dello Standard di Calibrazione Liofilo, essa è descritta nella scheda tecnica dedicata.

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC77016	Calibratore liofilo in urina per Amine Biogeniche	7 x 2 x 1 ml
LC77019	Controllo liofilo in urina per Amine Biogeniche - Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
SK14610	Starter kit per Trittico urinario	1 Pz
Z959757902	Colonna analitica Zorbax RRHD C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	1 Pz

Indice Riferimenti Bibliografici

- 1- Clinica Chimica Acta 398 53-56 ' HPLC-mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: Vanilmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid.'
 - 2- JALM 01:04 387-399 'Practical LC-MS/MS Method for 5-Hydroxyindoleacetic acid in urine'
 - 3- Current Opinions in Biotechnology 2017, 43:34-40 'The future of NMR-based metabolomics'
- Chimica Clinica Acta, accepted manuscript 'Simple dilute-and-shot method for urinary vanilmandelic and homovanillic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry'

DOTAZIONE STRUMENTALE MINIMA RICHIESTA

LC-MS/MS Triplo Quadrupolo con pompa binaria
MRM mode, ESI negativo

DOTAZIONE OPZIONALE

Autocampionatore
Computer gestionale.

MODALITÀ DI RACCOLTA DELLE URINE DELLE 24 H E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE URINARIO

Prima di iniziare la raccolta versare nel recipiente circa 5 ml di HCl 5 M per ogni litro di Urina che presumibilmente verrà emessa. Per la raccolta di una persona adulta occorreranno circa 10 ml. Per la raccolta di un bambino occorreranno circa 5 ml.

Un campione di circa 10 ml di urina delle 24 h va prelevato ed inviato al Laboratorio con l'indicazione della diuresi totale. Controllare che le urine pervenute abbiano un pH tra 2,0 e 4,0. ***Se il pH è > di 7 il campione potrebbe non essere idoneo per il test.*** Congelare il campione a -20 °C se l'analisi deve essere differita. Stabile oltre 2 mesi.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1

Dispensare in una vial:

- 180 µl di **Reagente B - Soluzione di Diluizione**
- 20 µl di **Reagente A - Soluzione Standard Interno**
- 20 µl di **Calibratore (C0-C6)/Controlli/Campioni**

Vortex per 10 sec.

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

INIEZIONE

- Iniettare 2 µl della soluzione in HPLC.

TRITTICO URINARIO in LC/MS - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Zorbax RRHD C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm), termostata a 60 °C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Fase Mobile M2 : Fase Mobile M1 (90 : 10 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 20 minuti. Condizionare ulteriormente flussando una soluzione di Fase Mobile M2 : Fase Mobile M1 (90 : 10 v/v) per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile M2 al flusso di 400 µl / minuto per 15 minuti. **Due iniezioni di 50% Acqua di grado HPLC / 50% Acetonitrile prima di procedere alle serie analitiche.**

NON è possibile fare 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

Lavare con una soluzione di Fase Mobile M2 : Fase Mobile M1 (90 : 10 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 20 minuti. La colonna va stoccata in questa soluzione.

LAVAGGIO DELL'AGO DI INIEZIONE

Lavare l'ago di iniezione con una soluzione di Metanolo : H₂O (85 : 15 v/v).

PARAMETRI SETTATI SU WATERS XEVO TQS MICRO

Capillary Voltage (kV)	3,0
Desolvation Gas (L/ora)	1000
Desolvation Temperature (°C)	600
Source Temperature(°C)	150

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO WATERS XEVO TQS MICRO)

Analita	Transizioni MRM m/z	ENERGIA DI COLLISIONE
HVA	181.0>121.9	15
5-HIAA	190>145.9	5
VMA	197.0>137.9	10
HVA-D5	186.0>142.0	6
5-HIAA-13C6	196.0>152.0	10
VMA-D3	200.0>137.0	18

SETTAGGIO DELGRADIENTE

Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	FLUSSO (μl/min)
0	100	0	400
0.5	100	0	400
3.5	70	30	400
3.51	0	100	400
4.50	0	100	400
4.51	100	0	400
6.0	100	0	400

TRITTICO URINARIO IN LC/MS

(Cromatogrammi di riferimento)

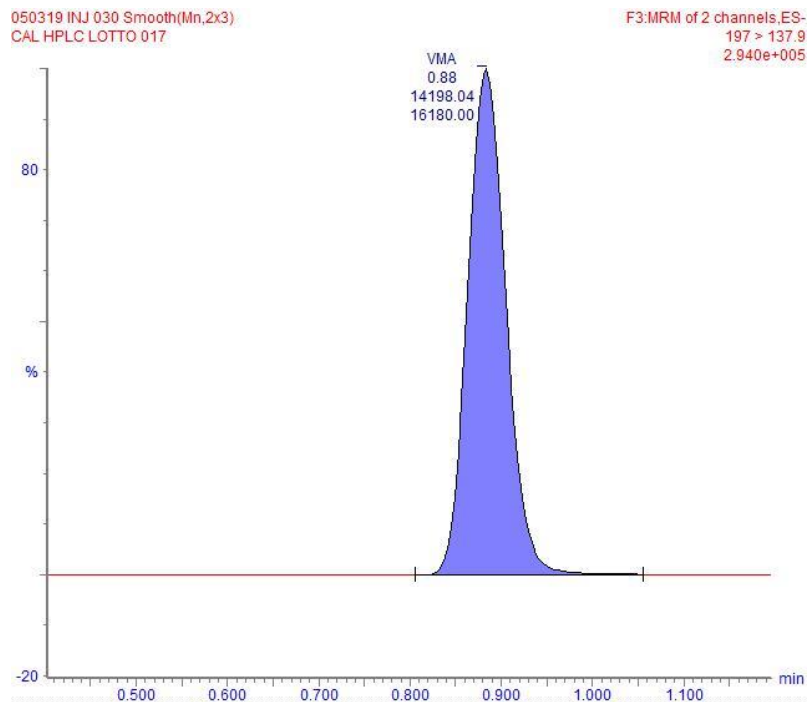


Fig. 3 :	Calibratore urinario
	R.T. 0.88 VMA

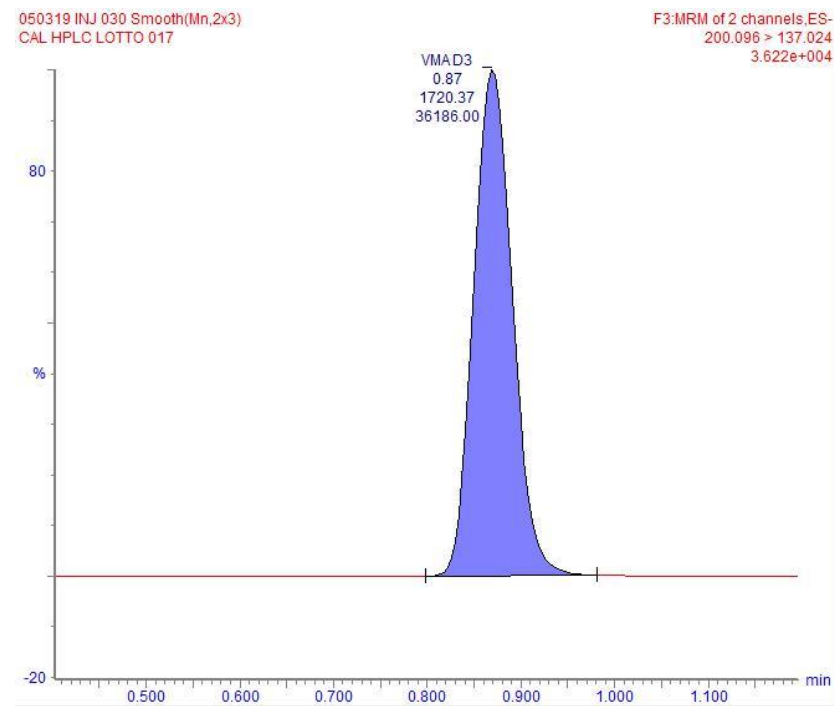


Fig. 4 :	Calibratore urinario
	R.T. 0.87 VMA-D3

TRITTICO URINARIO IN LC/MS

(Cromatogrammi di riferimento)

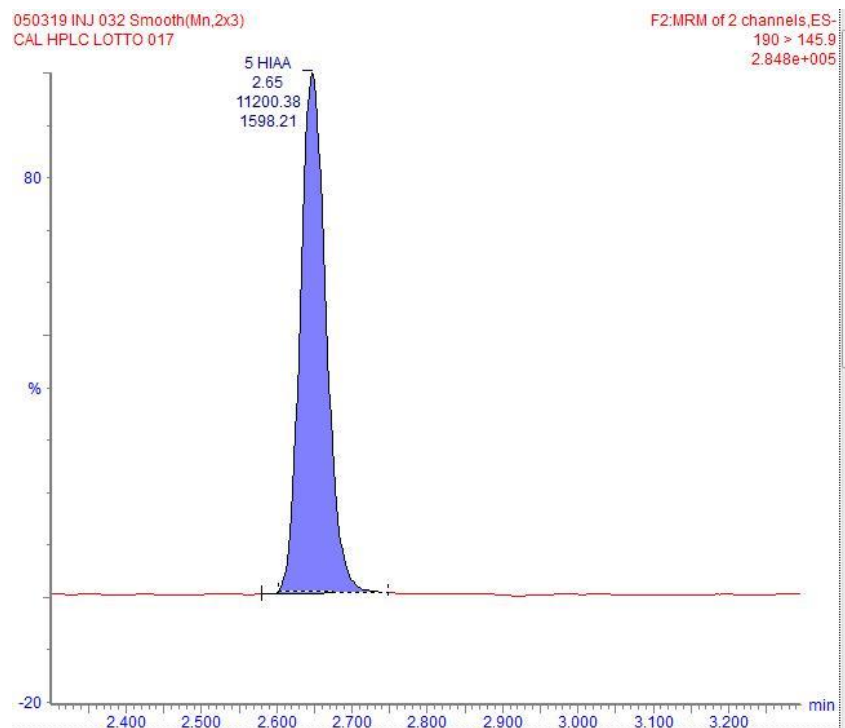


Fig. 5 :	Calibratore urinario
	R.T. 2.65 5-HIAA

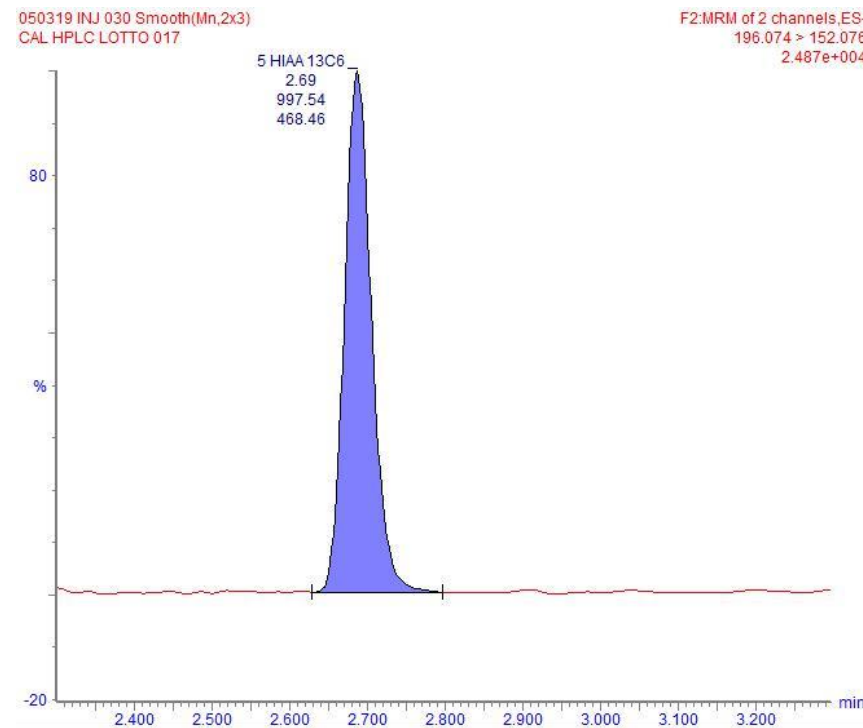


Fig. 6 :	Calibratore urinario
	R.T. 2.69 5-HIAA-13C6

TRITTICO URINARIO IN LC/MS

(Cromatogrammi di riferimento)

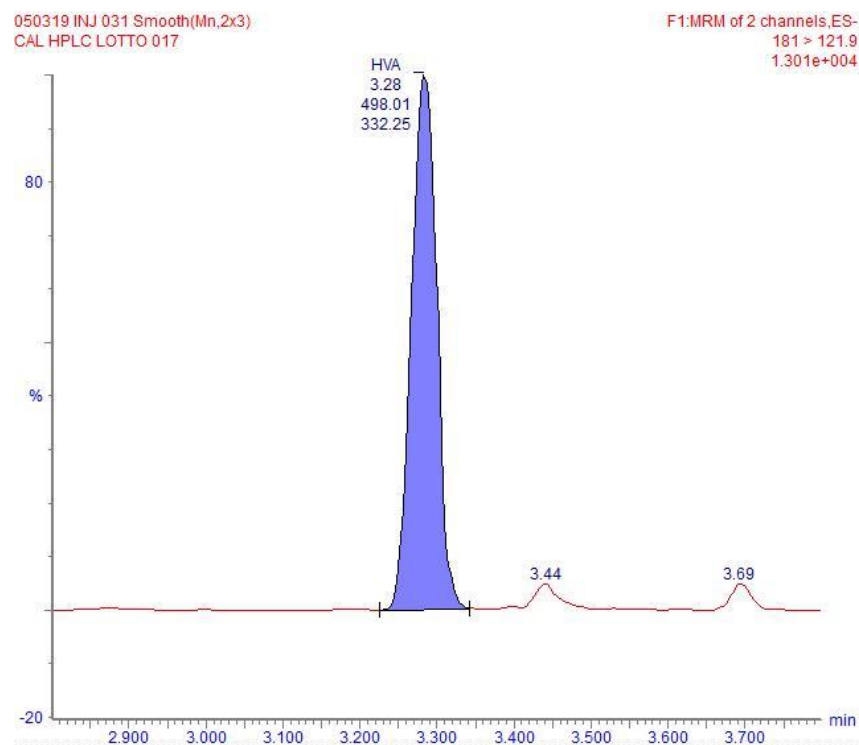


Fig. 7 :	Calibratore urinario
	R.T. 3.28 HVA

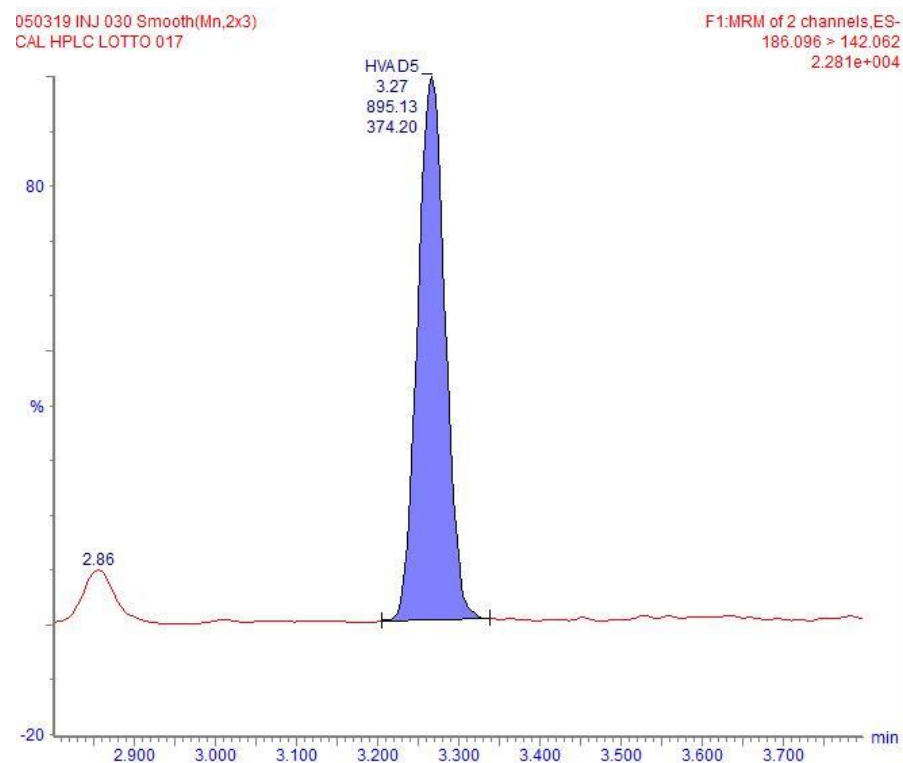


Fig. 8 :	Calibratore urinario
	R.T. 3.27 HVA-D5