

CATECOLAMINE LIBERE e METANEFRIINE LIBERE e TOTALI URINARIE in LC/MS – **Codice LC77010**

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.

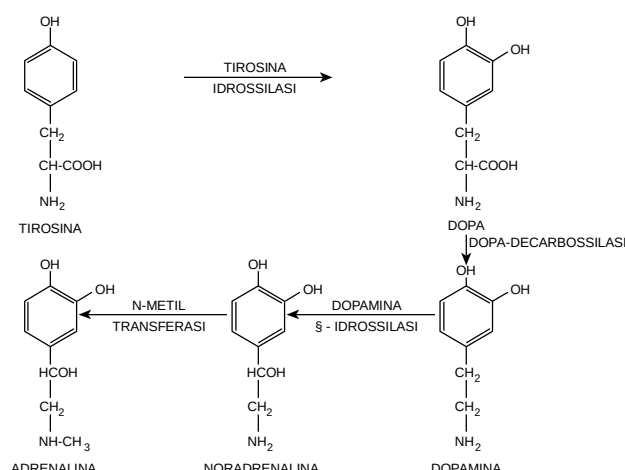


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

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-idrossifenilglicole (MHPG).
- Esiste alternativamente un'altra via metabolica che le trasforma in **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).

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.

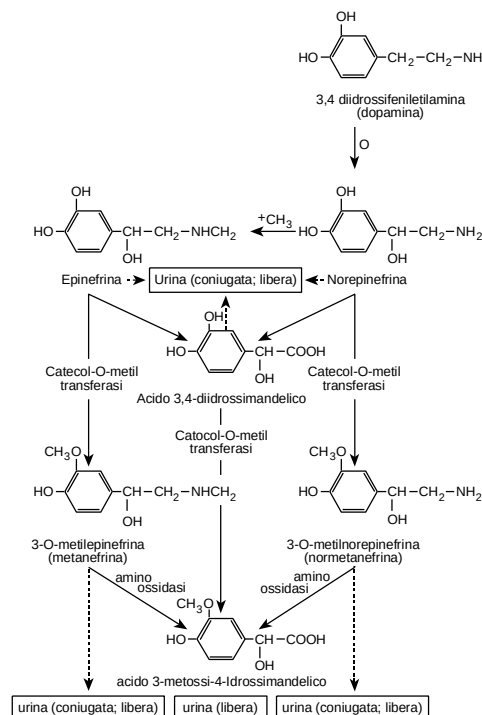


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

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 Tecniche

Principio del Metodo:

Il campione urinario viene trattato con estrazione SPE e iniettato in LC-MS/MS.

Recupero :

>98 %

Valori di Normalità nelle Urine delle 24 h:

ADRENALINA	2-22 µg/24 h
NORADRENALINA	20-81 µg/24 h
DOPAMINA	40-400 µg/24 h

METANEFRIE TOTALI URINARIE

METANEFRIINA	52 - 341 µg/24 h
NORMETANEFRIINA	88 - 444 µg/24 h
3-METOSSITIRAMINA	55 - 247 µg/24 h

METANEFRIE LIBERE URINARIE

METANEFRIINA*	Uomini < 53.3 µg/24 h Donne < 33.3 µg/24 h
NORMETANEFRIINA*	Uomini < 43.2 µg/24 h Donne < 35.2 µg/24 h

* Woo HI Clin Biochem 49 (7-8):573-9

Sensibilità analitica (LLOD) :

Metanefrina	1,0 µg/L
Normetanefrina	2,0 µg/L
Adrenalina	0,5 µg/L
Noradrenalina	2,0 µg/L
Dopamina	5,0 µg/L
3-Metossitiramina	2,0 µg/L

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

Metanefrina	4,4 µg/L
Normetanefrina	7,3 µg/L
Adrenalina	1,2 µg/L
Noradrenalina	7,2 µg/L
Dopamina	32,5 µg/L
3-Metossitiramina	6,0 µg/L

Linearità :

Metanefrina	4,4 - 5000 µg/L
Normetanefrina	7,3 - 5000 µg/L
Adrenalina	1,2 - 500 µg/L
Noradrenalina	7,2 - 500 µg/L
Dopamina	32,5 - 500 µg/L
3-Metossitiramina	6,0 - 5000 µg/L

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Metanefrina:

Ci	Cs
154,4 µg/l	465,5 µg/l
4,94%	1,21%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Metanefrina:

Ci	Cs
154,4 µg/l	465,5 µg/l
4,10%	1,32%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Metanefrina:

C LLOQ	Cm	CUP
4,4 µg/l	307,2 µg/l	578,6 µg/l
1,02%	0,28%	0,49%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Metanefrina:

C LLOQ	Cm	CUP	
4,4 µg/l	307,2 µg/l	578,6 µg/l	
1,85%	0,28%	2,78%	

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Normetanefrina:

Ci	Cs
187,6 µg/l	567,3 µg/l
6,69%	2,20%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Normetanefrina:

Ci	Cs
187,6 µg/l	567,3 µg/l
4,81%	1,73%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Normetanefrina:

C LLOQ	Cm	CUP	
7,3 µg/l	372,4 µg/l	707,5 µg/l	
3,10%	3,55%	1,23%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Normetanefrina:

C LLOQ	Cm	CUP	
7,3 µg/l	372,4 µg/l	707,5 µg/l	
3,37%	3,92%	2,07%	

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Adrenalina:

Ci	Cs
14,3 µg/l	40,6 µg/l
3,25%	3,04%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Adrenalina:

Ci	Cs
14,3 µg/l	40,6 µg/l
4,25%	2,74%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Adrenalina:

C LLOQ	Cm	CUP	
1,2 µg/l	26,1 µg/l	50,7 µg/l	
2,17%	0,95%	0,46%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Adrenalina:

C LLOQ	Cm	CUP	
1,2 µg/l	26,1 µg/l	50,7 µg/l	
3,76%	3,72%	4,28%	

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Noradrenalina:

Ci	Cs
33,1 µg/l	94,7 µg/l
3,78%	1,02%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Noradrenalina:

Ci	Cs
33,1 µg/l	94,7 µg/l
3,33%	2,28%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Noradrenalina:

C LLOQ	Cm	CUP	
7,2 µg/l	62,9 µg/l	115,1 µg/l	
3,32%	1,83%	0,68%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Noradrenalina:

C LLOQ	Cm	CUP	
7,2 µg/l	62,9 µg/l	115,1 µg/l	
2,29%	2,00%	3,75%	

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Dopamina:

Ci	Cs
495,3 µg/l	1.283,2 µg/l
4,34%	5,49%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Dopamina:

Ci	Cs
495,3 µg/l	1.283,2 µg/l
4,64%	4,38%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Dopamina:

C LLOQ	Cm	CUP	
32,5 µg/l	822,6 µg/l	1.598,8 µg/l	
0,55%	1,24%	0,14%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Dopamina:

C LLOQ	Cm	CUP	
32,5 µg/l	822,6 µg/l	1.598,8 µg/l	
2,85%	0,88%	2,41%	

Accuratezza intra serie (errore relativo %) 3-Metossitiramina:

Ci	Cs
150 µg/l	300 µg/l
7,46%	5,80%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) 3-Metossitiramina:

Ci	Cs
150 µg/l	300 µg/l
8,69%	5,88%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) 3-Metossitiramina:

C LLOQ	Cm	CUP	
6 µg/l	240 µg/l	500 µg/l	
1,57%	1,82%	0,31%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) 3-Metossitiramina:

C LLOQ	Cm	CUP	
6 µg/l	240 µg/l	500 µg/l	
9,39%	4,09%	5,82%	

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9979 ± 0,0008 Metanefrina
 0,9973 ± 0,0001 Normetanefrina
 0,9958 ± 0,0028 Adrenalina
 0,9942 ± 0,0027 Noradrenalina
 0,9937 ± 0,0001 Dopamina
 0,9973 ± 0,0001 3-Metossitiramina

Contenuto della confezione (100 test) :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C, eccetto **Reagente A**.

Conservare a – 20 °C

Reagente A – Soluzione Standard Interno, **1 x 0,8 ml**

Reagente B – Soluzione Tampone, **1 x 100 ml**

Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 100 ml**

Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 100 ml**

Reagente E – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 100 ml**

Reagente F – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 100 ml**

Reagente G – Soluzione Eluente, **1 x 60 ml**

Reagente H – Soluzione di Diluizione, **1 x 10 ml**

WASH SOLUTION – **2 x 500 mL**

Calibratore urinario – Livello 0, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 1, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 2, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 3, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 4, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 5, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore urinario – Livello 6, 2 x 1 ml

Codice LC77016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Reagente I – Reagente di Idrolisi Metanefrine, **1 x 5 ml**

Reagente L – Soluzione Stabilizzante Metanefrine, **1 x 5 ml**

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **1 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **2 x 500 ml**

Colonne di Clean up, 100 pz

Strumentazione minima necessaria:

LC-MS/MS Triplo Quadrupolo con pompa binaria
MRM mode, ESI positivo
Software 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 :

PREPAZIONE DEGLI STANDARD INTERNI

Preparare prima di ogni seduta analitica un volume idoneo in base al numero di campioni (considerare 50 µl a campione)

- 920 µl di **Reagente H** - Soluzione di Diluizione
- 80 µl di **Reagente A** - Soluzione Standard Interno

FASE 2 :

Preparazione dei Campioni, del Calibratore e dei Controlli

	Calibratore – Livello 0	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Calibratore – Livello 6	Campione	Controllo
Reagente B – Soluzione Tampone	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Calibratore – Livello 0	400 µl								
Calibratore – Livello 1		400 µl							
Calibratore – Livello 2			400 µl						
Calibratore – Livello 3				400 µl					
Calibratore – Livello 4					400 µl				
Calibratore – Livello 5						400 µl			
Calibratore – Livello 6							400 µl		
Campione								400 µl	
Controllo									400 µl
Soluzione Standard interno precedentement e preparata	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Vortex per 10 sec.

FASE 3 : Condizionamento Colonne Clean up

- Versare in colonna 1,0 ml di **Reagente C** – Sol.di Condizionamento N° 1
Scartare l'eluato
- Versare in colonna 1,0 ml di **Reagente D** – Sol.di Condizionamento N° 2
Scartare l'eluato

FASE 4 : Caricamento dei Campioni, Calibratore e Controlli

- Versare tutti i Campioni, Calibratore e Controlli precedentemente preparati nelle colonne Clean-up
Scartare l'eluato

FASE 5: Lavaggio colonne Clean up

- Versare 1 ml di **Reagente E – Soluzione di Lavaggio N° 1** nelle Colonne di Clean-up
Scartare l'eluato
- Versare 1 ml di **Reagente F – Soluzione di Lavaggio N° 2** nelle Colonne di Clean-up
Scartare l'eluato

FASE 6 : Eluizione

Posizionare le provette di raccolta sotto le colonnine

- Versare 250 µl di **Reagente G – Soluzione Eluente** nelle Colonne di Clean-up
Raccogliere l'eluato
- Versare 250 µl di **Reagente G – Soluzione Eluente** nelle Colonne di Clean-up
Raccogliere l'eluato

Trasferire l'eluato in vials

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

INIEZIONE :

- Iniettare 2-10 µl dell'eluato nel sistema cromatografico.

PROCEDURA DI IDROLISI PER METANEFINE TOTALI

IDROLISI DEL CAMPIONE

1. In provette in vetro da 10 ml con tappo in teflon trasferire:
 - 500 µl di Campione Urinario o Calibratore/Controllo Urinario ricostituito
 - 500 µl di Acqua di grado HPLC
 - 50 µl di **Reagente I – Reagente di Idrolisi**
2. Chiudere ermeticamente le provette con il tappo e assicurarsi della tenuta.
3. Porre in stufa a 90°C per 30 minuti
4. Lasciar raffreddare, quindi aggiungere 50 µl di **Reagente L – Soluzione Stabilizzante**
5. Controllare che il pH sia fra 4,5 e 6,0, eventualmente aggiustarlo con NaOH 1N o HCl 1N.

A fine idrolisi, il campione va trattato come da PROCEDURA ANALITICA precedente (pagg. 7 – 8)

CATECOLAMINE/METANEFRINE - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* ACQUITY UPLC BEH (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), termostata a 30 °C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Acetonitrile : H₂O (85 : 15 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile M2 al flusso di 600 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 Acetonitrile : H₂O (85 : 15 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. La colonna va stoccata in questa soluzione. Non far fluire per nessun motivo una percentuale di acqua maggiore del 40% in colonna analitica.

LAVAGGIO DELL'AGO DI INIEZIONE

Usare la Wash Solution

PARAMETRI SETTATI SU WATERS XEVO TQS MICRO

Capillary Voltage	0.4
Desolvatation Gas (L/ora)	1000
Cone Gas(L/ora)	0
Desolvatation Temperature (°C)	500
Source Temperature(°C)	150

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO WATERS XEVO TQS MICRO)

Analita	Transizioni MRM m/z	ENERGIA DI COLLISIONE
Metanefrina	198.1>180	8
	198.1>165.1	18
Normetanefrina	184.1>166	8
	184.1>134.1	18
3-Metossitiramina	168.0>91.0	22
	168.0>119.0	20
Dopamina	154.0>91	20
	154.0>119	18
Epinefrina	184.1>166	8
	184.1>107	20
Norepinefrina	170>152	6
	170>107	20

STANDARD INTERNO DI RIFERIMENTO

Molecola	Standard Interno
Adrenalina	Adrenalina-d6
Noradrenalina	Noradrenalina-d6
Dopamina	Dopamina-d4
Metanefrina	Metanefrina-d3
Normetanefrina	Normetanefrina-d3
3-Metossitiramina	Metanefrina-d3

SETTAGGIO DELGRADIENTE

Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	FLUSSO (µl/min)
0	0	100	600
1.0	0	100	600
2.0	10	90	600
2.1	10	90	1000
2.5	30	70	1000
2.6	0	100	1000
3.9	0	100	1000
4.0	0	100	600

ACCESSORIE E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC77016	Calibratore liofilo urinario per Catecolamine/Metanefrine	7 x 2 x 1 ml
LC77019	Controllo liofilo urinario per Amine Biogeniche - Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
LC77011	Fase Mobile M1	4 x 500 ml
LC77021	Fase Mobile M2	4 x 500 ml
SK77010	Starter kit per Catecolamine/Metanefrine urinarie	11 x 1 ml
LC77030	Standard interno Mix Solution	1 x 800 µl
S186004801	Colonna analitica ACQUITY UPLC BEH AMIDE (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	1 Pz
S51843550	Vials di vetro a calicetto	100 Pz
S51820717	Tappi per Vials di vetro a calicetto	100 Pz

CATECOLAMINE/METANEFRINE URINARIE (Cromatogrammi di riferimento)

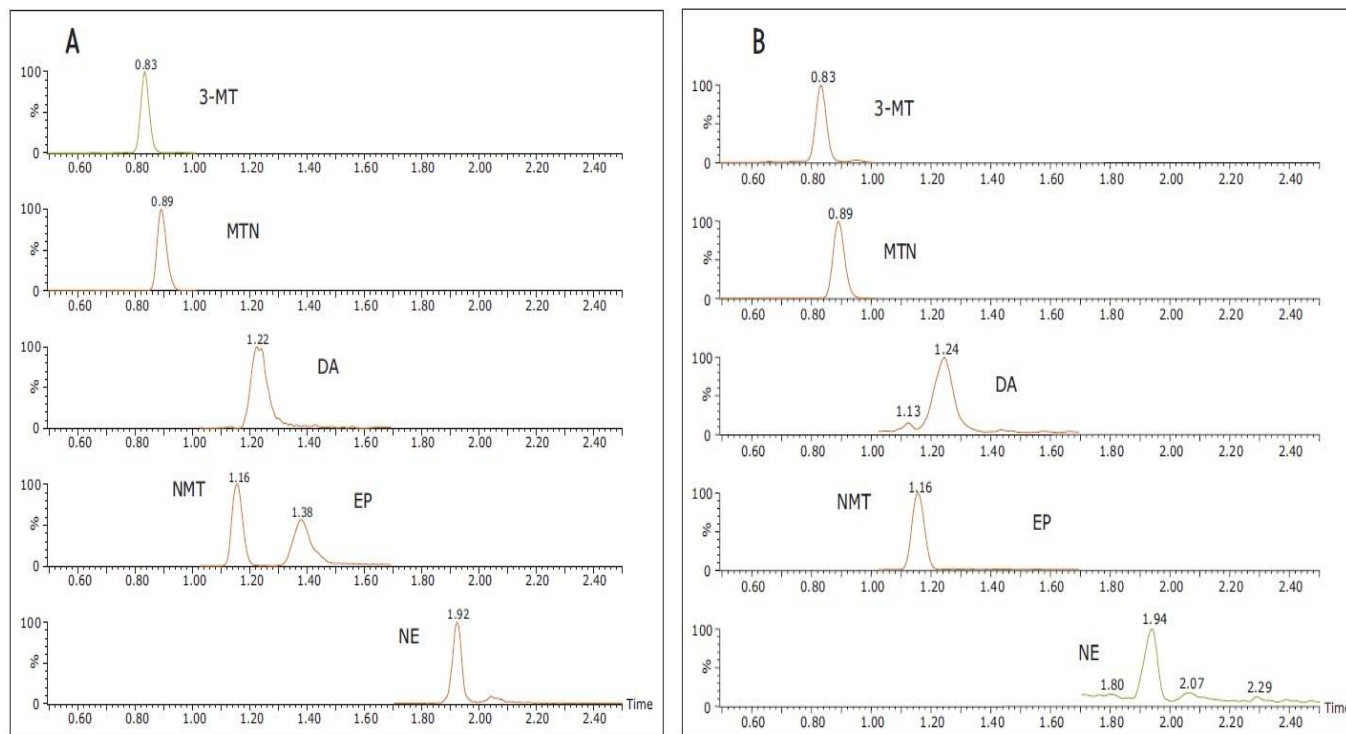


Figure 2. Chromatography of catecholamines and metanephrines on the ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm.

A. Representative 50 ng/mL calibration standard.

B. Unspiked urine sample showing chromatography of endogenous catecholamines and metanephrines. Chromatographic conditions are detailed in the methods section.