

# **CATECOLAMINE LIBERE URINARIE CON RESINA IN FLUORIMETRIA FAST**

## **Codice Z10710**

### **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.

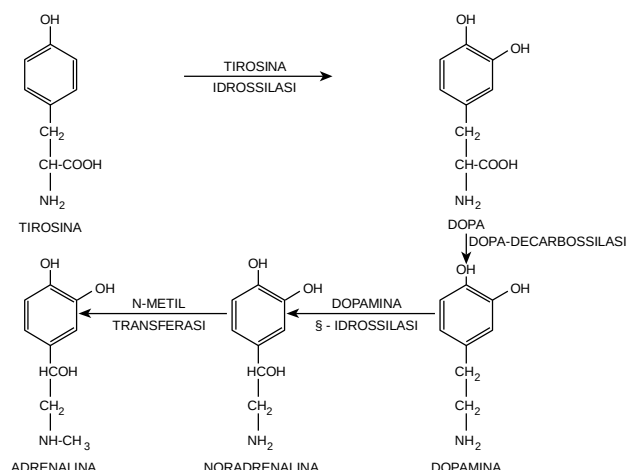


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

### **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.

|        |                                                     |         |
|--------|-----------------------------------------------------|---------|
| N° 009 | Catecolamine urinarie resina in Fluorimetria - FAST | 06/2024 |
|--------|-----------------------------------------------------|---------|

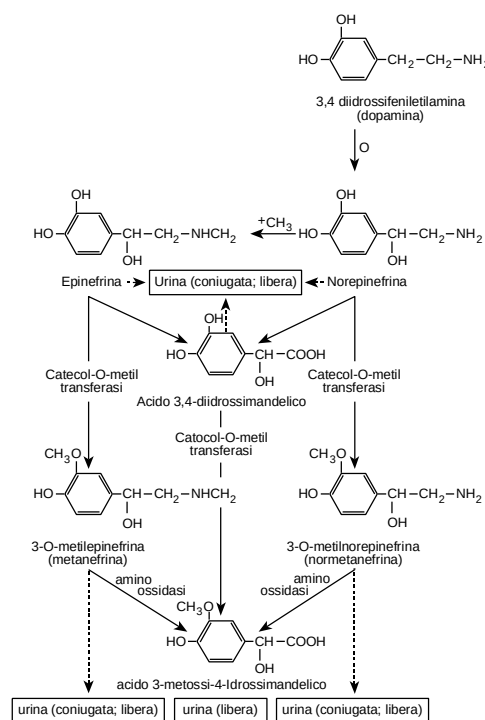


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

## 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.

## CHIMICA E DOSAGGIO MEDIANTE TECNICA HPLC

Il presente metodo consente di analizzare le Catecolamine Urinarie senza ricorrere a procedure di Clean-up. Dopo derivatizzazione 20 µl della soluzione vengono iniettati e letti al fluorimetro.

## **CARATTERISTICHE DEL KIT**

### **Principio del Metodo:**

Le Catecolamine (ADRENALINA - NORADRENALINA - DOPAMINA), dopo purificazione con resina, vengono complessate con due reagenti selettivi e incubate a 37 °C per 30 minuti o a 70 °C per 15 minuti. L'eluato, dopo aggiunta di 300 µl di H<sub>2</sub>O, viene direttamente iniettato in HPLC.

**Recupero del Metodo :** > 98 %

**Sensibilità del Metodo :** < 0,02 µg/l

**Linearità del Metodo :** 0,02 - 2.000 µg/l

**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 |

### **Contenuto della confezione :**

**Reagente A** - Resina di Purificazione, **1 x 50 ml**

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

**Reagente B1** - Tampone di purificazione, **1 x 50 ml**

**Reagente C** - Soluzione Estraiante, **1 x 200 ml**

**Reagente D** - Soluzione Starter, **1 x 2 ml**

**Reagente E** - Soluzione Derivatizzante, **1 x 2 ml**

**Reagente G** – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

**Reagente H** - Soluzione Standard interno, **1 x 5 ml**

**Calibratore Urinario Liofilo**, **1 x 5 ml**

**Reagente M** - Fase Mobile, **2 x 500 ml**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura ambiente ( ≤ 20 °C ), eccetto la Soluzione Test e lo Standard interno che vanno conservati a 2-8 °C e il Calibratore Liofilo, la scadenza del quale e la modalità di conservazione sono descritti nelle Avvertenze.

(Da agitare bene prima dell'uso per inversione; ripetere l'operazione ogni 10 campioni)

**Conservare a 2-8 °C**

**Conservare a 2-8 °C**

**Da diluire 1:10 prima dell'uso**

**Codice Z10116**

**Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

### **Dotazione strumentale minima richiesta :**

Strumento HPLC isocratico con loop da 20 o 50 µl  
Detector Fluorimetrico  $\lambda_{EX}=360$  nm,  $\lambda_{EM}=490$  nm  
Registratore di cromatogrammi.

### **Dotazione opzionale :**

Autocampionatore  
Computer gestionale.

### **Modalità di raccolta delle Urine delle 24 h :**

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 tassativamente che le urine pervenute abbiano un pH tra 2,5 e 3,5.**

***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. Stabili oltre 2 mesi.

## **PROCEDURA PREANALITICA**

In una provetta da 1,5 ml con tappo di chiusura pipettare:

- 400 µl di **Reagente C** - Sol. Estraeante
- 20 µl di **Reagente G** - Sol. Test
- 20 µl di **Reagente H** - Standard Interno (diluito 1:10 con Acqua grado HPLC)
- 20 µl di **Reagente D** - Starter
- 20 µl di **Reagente E** - Sol. Derivatizzante

- Incubare a 70 °C per 15 minuti

***Raffreddare***

### **INIEZIONE :**

Iniettare 20 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. 3. 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:** Verifica del pH

Trasferire in una provetta da 10 ml in vetro o plastica trasparente:

- 1 ml di **Reagente B** - Soluzione Tampone
- 1 ml di **Campione** o **Calibratore** o **Controllo**

***Al vortex per 20 secondi***

- Verificare che i **Campioni**, i **Calibratori** ed i **Controlli** così trattati abbiano il  $7 \leq \text{pH} \leq 8$  ; eventualmente correggerli con aggiunta di poca quantità di NaOH 2N.
- Agitare per inversione il flacone della resina **Reagente A** (Ogni 10 campioni ripetere l'agitazione)

### **FASE 2 :** Purificazione dei Campioni

Trasferire in una provetta da 10 ml in vetro o plastica trasparente:

- 500 µl **Reagente B1**-Tampone di purificazione
- 500 µl **Reagente A** - Resina di purificazione
- 1000 µl **Campioni**, **Calibratori** o **Controlli** preparati nella **FASE 1**
- 50 µl **Reagente H** - Standard Interno (diluito 1:10 con Acqua grado HPLC)

***Al vortex per 20 secondi***

**FASE 3 :** Centrifugare a 4.000 rpm per 2 minuti

**FASE 4 :** Aspirare il sovranatante e gettarlo

**FASE 5 :** Estrazione

Pipettare nella provetta contenente il precipitato 2 ml di **Reagente C** - Sol. Estraeante

***Al vortex per 20 secondi***

**FASE 6 :** Centrifugare a 4.000 rpm per 2 minuti

**FASE 7:** Procedura di derivatizzazione

Pipettare in una provetta di plastica da 1,5 ml con tappo di chiusura :

- 200 µl di **Campione** proveniente dalla procedura di purificazione
- 20 µl di **Reagente D** - Starter
- 20 µl di **Reagente E** - Sol. Derivatizzante

***Al vortex per 20 secondi***

**FASE 8 :** Incubare a 37 °C per 30 minuti oppure a 70 °C per 15 minuti.

**FASE 9 :** Aggiungere 300 µl di H<sub>2</sub>O e agitare al Vortex

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

### **INIEZIONE:**

Iniettare 20 µl dell'eluato nel Cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.

## **CATECOLAMINE LIBERE URINARIE FAST - Avvertenze**

### **REAGENTE G : SOLUZIONE TEST**

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| NOREPINEFRINA | circa 90,75 µg/l  |
| EPINEFRINA    | circa 28,80 µg/l  |
| DOPAMINA      | circa 545,25 µg/l |

### **PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO (Es. : Fluorimetro Jasco 821 FP)**

|                  |        |
|------------------|--------|
| λ DI ECCITAZIONE | 360 nm |
| λ di EMISSIONE   | 490 nm |
| SENSIBILITA'     | Media  |

### **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 del 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 **H<sub>2</sub>O : Metanolo (20 : 80 v / v) a pH acido (> 3)** e successivamente 30 ml di **H<sub>2</sub>O : Metanolo (80 : 20 v / v)**, al flusso di 1,5 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,5 ml/minuto e scaricare i primi 15 ml. Condizionare ulteriormente la colonna per 15 minuti anche a ricircolo di fase. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. **Per l'analisi delle Catecolamine è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase purchè si abbia l'accortezza di filtrare la stessa Fase Mobile con filtro da 0,22 µ prima di ogni seduta analitica.**  
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 30 ml di H<sub>2</sub>O : Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v / v) e scaricare. Flussare una soluzione di H<sub>2</sub>O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v / v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo, far passare 15 ml di H<sub>2</sub>O : Metanolo (20 : 80 v / v) prima di condizionala con la Fase Mobile. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.**

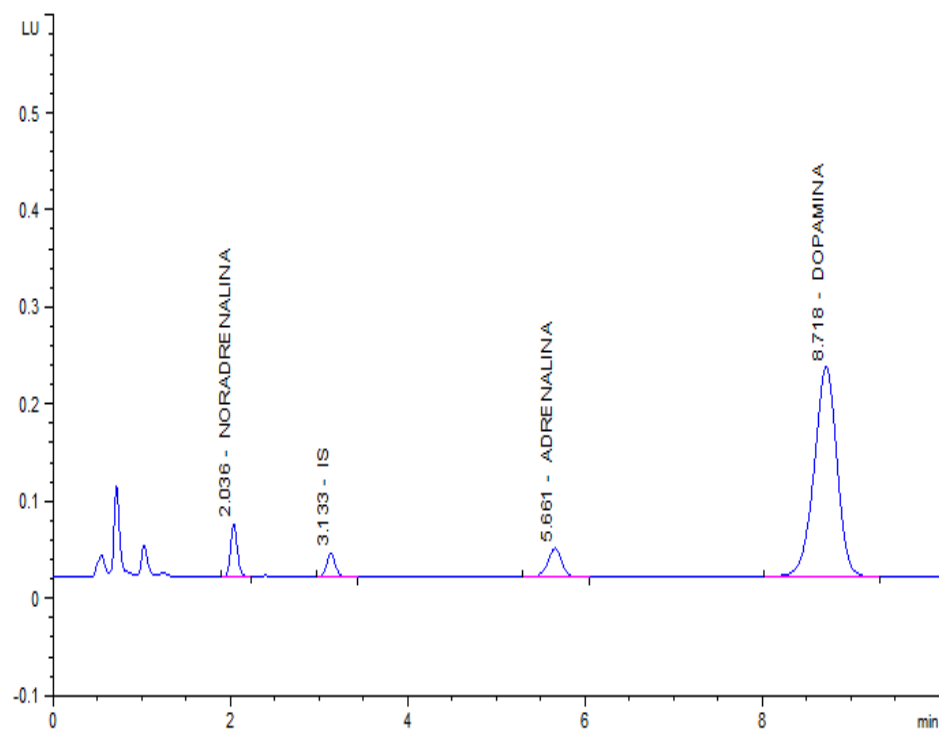
### **PARAMETRI HPLC**

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| LOOP                         | 20 o 50 µl    |
| Flusso di lavoro consigliato | 1,0 ml/minuto |
| Pressione corrispondente     | Circa 110 bar |

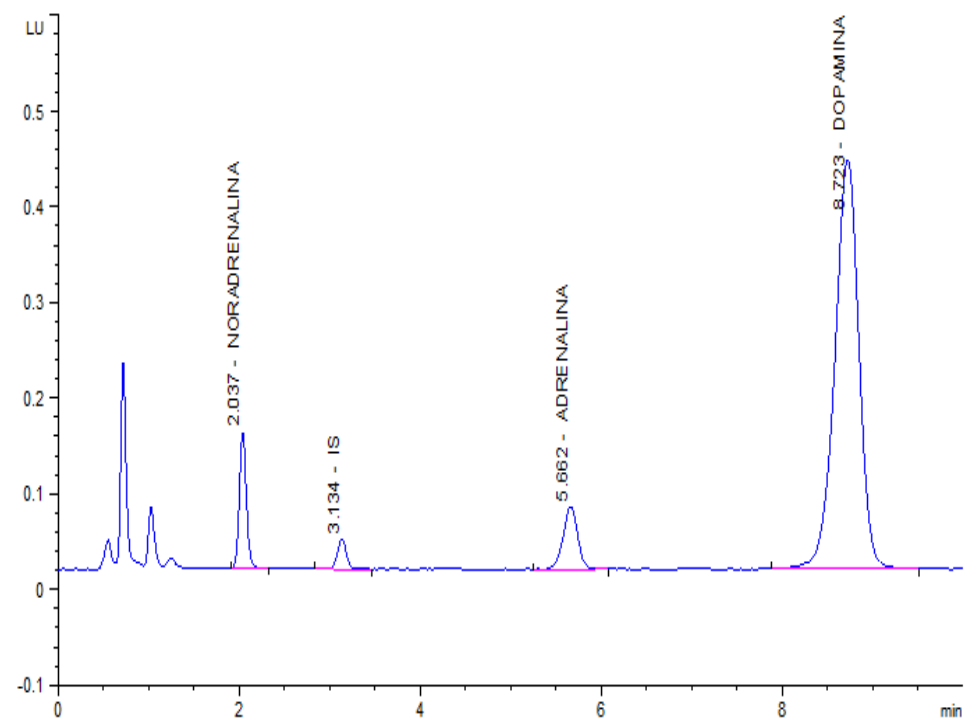
### **ACCESSORI E CONSUMABILI**

| CODICE            | DESCRIZIONE                                                    | CONFEZIONE   |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Z10116</b>     | Calibratore liofilo in urina per Catecolamine                  | 4 x 5 ml     |
| <b>Z10559</b>     | Controllo liofilo in urina per Amine Biogeniche, Livelli 1 e 2 | 2 x 5 x 5 ml |
| <b>Z699975902</b> | Colonna Analitica Poroshell 120, EC-C18 (50 x 4,6 mm - 2,7 µm) | 1 PZ         |
| <b>S90199511</b>  | Prefiltri Javelin                                              | 1 x 10 PZ    |
| <b>S29057U</b>    | Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite                | 1 x 100 PZ   |

# CATECOLAMINE LIBERE URINARIE IN FLUORIMETRIA FAST (Cromatogrammi di riferimento)



|                |                             |                  |            |
|----------------|-----------------------------|------------------|------------|
| <b>Fig. 3:</b> | <b>Calibratore urinario</b> |                  |            |
|                | R.T. 2.03                   | Noradrenalina    | 100,5 µg/l |
|                | R.T. 3.13                   | Standard interno |            |
|                | R.T. 5.66                   | Adrenalina       | 24,6 µg/l  |
|                | R.T. 8.71                   | Dopamina         | 312,8 µg/l |



|                |                       |                  |            |
|----------------|-----------------------|------------------|------------|
| <b>Fig. 4:</b> | <b>Controllo alto</b> |                  |            |
|                | R.T. 2.03             | Noradrenalina    | 187,8 µg/l |
|                | R.T. 3.13             | Standard interno |            |
|                | R.T. 5.66             | Adrenalina       | 52,7 µg/l  |
|                | R.T. 8.72             | Dopamina         | 639,6 µg/l |