

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Importado e distribuído por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói-RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
MS – nº 10350840132
SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

METANEFRINAS NA URINA POR HPLC

METANEPHRINES IN URINE-HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Metanefrinas em urina por HPLC.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
2020	Kit Reagente para Análise de Metanefrinas em Urina (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Metanefrinas em urina por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análises de metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina em urina empregando um sistema isocrático de HPLC com detector eletroquímico. O procedimento analítico inclui uma etapa de hidrólise ácida seguida de diluição em tampão de neutralização, que automaticamente ajusta o pH necessário para a etapa de extração. As catecolaminas são extraídas da amostra através da adsorção em colunas de preparação antes da análise em HPLC. A preparação da amostra é simples e garante a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A determinação dos níveis de metanefrinas na urina tem importância clínica no diagnóstico de feocromocitoma, neuroblastoma, ganglioneuroma e melanoblastoma

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica.

PRINCÍPIO

A técnica de detecção eletroquímica mais empregada na cromatografia líquida é a amperométrica, com potencial de trabalho constante. Os detectores amperométricos convencionais utilizam uma célula com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um terceiro eletrodo que atua na manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente elétrica no eletrodo de referência. O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado entre o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. Qualquer substância ativa eletroquimicamente que passe através da célula de detecção será oxidada ou reduzida. As transformações por oxidação ou redução de tal substância geram uma perda ou ganho de elétrons, resultando em uma corrente elétrica que pode ser detectada e medida pelo instrumento, amplificada e registrada como um sinal cromatográfico. Uma vez que somente um número limitado de grupos funcionais e estruturas químicas são susceptíveis a processos de oxi-redução, em um determinado potencial de trabalho, a detecção eletroquímica é caracterizada por sua alta sensibilidade e sua elevada seletividade.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Componentes	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de acetronitrila e trietilamina	1 x 1000 mL
Padrão de Calibração (líq.) (Calibration Standard)	Solução aquosa contendo normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina	1 x 10 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa contendo normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Ácido etilenodiaminotetracético	2 x 300 mL
Tampão de Lavagem (Wash Buffer)	Solução de hidróxido de sódio	2 x 250 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Solução de hidróxido de sódio	2 x 250 mL
Colunas de preparação (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício modificado em solução tamponada	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados durante a análise:

Artigo	Produto	Armazenamento
2021	Fase móvel	2 – 30°C
2023	Padrão de Calibração (líquido)	2 – 8 °C
2024	Padrão Interno	2 – 8 °C
2025	Tampão de Neutralização	2 – 30 °C
2026	Tampão de Lavagem	2 – 30 °C
2027	Tampão de Eluição	2 – 30 °C
2009	Padrão de Calibração em Urina (liof.)	< - 18°C
0040	Controle Endócrino em Urina, Nível Normal	2 – 8 °C
0050	Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico	2 – 8 °C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A fase móvel contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo químico livre de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão de Calibração (em solução): pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Tampão de Neutralização: pronto para uso.

Tampão de Lavagem: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

Padrão de Calibração em Urina (liofilizado):

O calibrador (artigo 2009) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir o calibrador liofilizado, pipetar exatamente 5,0 mL de água tipo I no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição.

Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo e evitar a exposição direta à luz. O calibrador reconstituído é estável por 5 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 3 meses), conservar a - 20 °C. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Controle Endócrino em Urina, Nível Normal e Patológico:

Os controles em urina (artigo 0040 e 0050) são submetidos a todo o processo de preparo das amostras. Os controles são incluídos em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir o controle liofilizado, pipetar exatamente 8,0 mL de água tipo I no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo e evitar a exposição direta à luz. O controle reconstituído é estável por 5 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 3 meses), conservar a - 20 °C. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 2120).
Padrão de Calibração em Urina, liofilizado (Chromsystems art. 2009).
Controle Endócrino em Urina, Nível Normal (Chromsystems art. 0040).
Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico (Chromsystems art. 0050)
Água tipo I ou grau HPLC.
Centrífuga.
Metanol grau HPLC.
HCl.
NaOH.
Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Deverão ser analisadas, preferencialmente, amostras de urina de 24 horas coletadas em recipientes contendo 10 mL de HCl 25%.

Estabilidade da amostra: as amostras coletadas desta forma são estáveis por 5 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): as amostras preparadas são estáveis por até 1 semana em temperatura ambiente e protegidas da luz. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20 °C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20µL, tempo de corrida 14 min.
Detector eletroquímico: +780 a +840 mV
Fluxo: 1,0 a 1,2 mL/min
Temperatura da coluna: Ambiente (aprox. 25 °C)

Procedimento de preparo de amostras:

Etapa de hidrólise:

1. Adicionar 100 µL de Padrão Interno a 1,0 mL de urina (amostra, calibrador 2009, controle) e ajustar o pH para 0,8 - 1,0 com HCl 2N;
2. Incubar em tubos de hidrólise fechados por 30 min. entre 90 e 100°C, resfriar imediatamente.

Etapa de neutralização:

Urina hidrolisada + 6,0 mL de tampão de neutralização. Uma mudança da cor amarela-amarronzada para roxa deve ocorrer agora!
Se a solução não adquirir cor roxa, adicionar NaOH 2N, gota a gota, até que ocorra a mudança de cor.

Etapa de extração e lavagem:

1. Aplicar toda a amostra de urina neutralizada na coluna de preparação. Descartar o eluato.
2. Lavar a coluna em seqüência com:
 - i. 10 mL de água destilada
 - ii. 5mL de tampão de lavagem e descartar cada eluato.

Eluição:

1. Adaptar um tubo plástico de amostra na saída da coluna.
2. Adicionar 5 mL de tampão de eluição e recolher o eluato no tubo acoplado. Agitar brevemente.

Análise no HPLC:

1. Acidificar o eluato com 150µL de ácido acético glacial (30µL por mL de eluato).
2. Injetar 20µL do eluato acidificado no sistema de HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos (1mL/min)
Normetanefrina	5,5
Metanefrina	7,0
Padrão Interno	8,4
3-Metoxitiramina	12,5

CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito}} [\mu\text{g/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = Aamostra
Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = ACalibrador
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = ISAmostra
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = ISCalibrador
Concentração C do analito A no calibrador = *CCalibrador

*Concentração de metanefrinas no padrão de calibração líquido (art. 2023):

Analito	Concentração (µg/L)
Normetanefrina	250
Metanefrina	250
Padrão Interno	1
3-Metoxitiramina	250 - 350

*Concentrações utilizando o padrão de calibração em urina (art. 2009):

A concentração dos analitos individuais depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

Cálculo da excreção de 24 horas (µg/24h)

Multiplique a concentração encontrada (µg/L) pelo volume da urina (L).

Cálculo do valor corrigido pela creatinina (em µg/g de creatinina)

Divida a concentração encontrada (µg/L) pela concentração de creatinina na urina (g/L).

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Normetanefrina	5,4585	0,1832
Metanefrina	5,0710	0,1972
3-Metoxitiramina	5,9809	0,1672

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Produto	Artigo	Apresentação
Padrão de Calibração em Urina, liofilizado	2009	5 x 5 mL
Controle Endócrino em Urina, Nível Normal	0040	10 x 8 mL
Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico	0050	10 x 8 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Faixa de Medição:

O método é considerado linear para todas as metanefrinas em concentrações que variam de 5 a 5000 µg/L de urina.

Recuperação:

Analito	Recuperação
Normetanefrina	87%
Metanefrina	83%
Padrão Interno	85%
3-Metoxitiramina	variável

Precisão:

A determinação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras, analisadas em duas diferentes concentrações.

Precisão intra-ensaio n = 10	Coeficiente de variação (%) / Concentração (µg/L)	
	Normetanefrina	2,0% / 365 µg/L
Metanefrina	3,1% / 172 µg/L	2,3% / 1250 µg/L
3-Metoxitiramina	2,6% / 182 µg/L	2,2% / 1391 µg/L

Precisão inter-ensaio n = 100	Coeficiente de variação (%) / Concentração (µg/L)	
	Normetanefrina	4,0% / 365 µg/L
Metanefrina	5,4% / 172 µg/L	3,8% / 1250 µg/L
3-Metoxitiramina	4,6% / 182 µg/L	4,1% / 1391 µg/L

VALORES DE REFERÊNCIA

Analito	Referência 1	Referência 2
Normetanefrina	Até 800 µg/24h	Até 390 µg/24h
Metanefrina	Até 400 µg/24h	Até 320 µg/24h

Os valores da Referência 1 são do Hospital Universitário de Großhadern, da Universidade de Munique. Os valores da Referência 2 são de Thomas L., Labor und Diagnose.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características de sua população.

LITERATURA

1. Lenz T, Gossmann J et al. Diagnosis of Pheochromocytoma. Clin Lab. 48:5-18, 2002.
2. Wisser H, Bertsch T. Katecholamine und Katecholaminmetabolite, in: Thomas L, Labor und Diagnose, 6.Aufl. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main. S: 1425-1440, 2005.
3. Hernandez FC, Sanchez M et al. A five-year report on experience in the detection of pheochromocytoma. Clin Biochem. 33(8):649-655, 2000.
4. Gerlo EA, Sevens C. Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: diagnostic value in 19 cases. Clin Chem. 40(2):250-256, 1994.
5. Héron E, Chatellier G et al. The urinary metanephrine-to-creatinine ratio for the diagnosis of pheochromocytoma. Ann Intern Med. 125:300-303, 1996.
6. Witteles RM, Edwin BA et al. Sensitivity of diagnostic and localization testes for pheochromocytoma in clinical practice. Arch Intern Med. 160:2521-2524, 2000.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de