

METANEPHRINES IN URINE-HPLC METANEFRINAS NA URINA POR HPLC

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

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 oxidação ou 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	1 x 1000 ml
Padrão de Calibração (líq.) (Calibration Standard)	Solução aquosa contendo HCl	1 x 10 ml
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa contendo normetanefrina, metanefrina e 3-	1 x 10 ml

	metoxitiramina	
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 preparo (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício	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 armazenamento para os reagentes do kit, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados durante a análise:

Artigo	Produto	Armazenamento
2021	Fase móvel	18 – 30°C
2023	Padrão de Calibração (líquido)	2 – 8 °C
2024	Padrão Interno	2 – 8 °C
2025	Tampão de Neutralização	18 – 30°C
2026	Tampão de Lavagem	18 – 30°C
2027	Tampão de Eluição	18 – 30°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.

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

Normalmente, amostras de urina de 24 horas são usadas para esta análise. Caso não seja possível, urina espontânea também pode ser utilizada e, neste caso, os dados devem ser referidos como urina creatinina. A urina de 24 horas deve ser coletada 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 -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): as amostras preparadas são estáveis antes de acidificar com ácido acético (pH > 7) por 3 dias em temperatura ambiente e por 1 semana em 2 a 8°C. Após a acidificação são estáveis por 1 dia em temperatura ambiente e por no máximo 7 dias em 2 a 8°C. Amostras armazenadas abaixo de -18 °C, antes ou depois da acidificação, são estáveis por pelo menos 4 semanas.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20µl,

tempo de corrida 14 min.

Detector +780 a +840 mV

eletroquímico:

Fluxo: 1,0 a 1,2 ml/min

Temperatura da Ambiente (aprox. 25 °C)

coluna:

Procedimento de preparo de amostras:

Hidrólise ácida das amostras de urina

1. Adicionar 1,0 ml de urina a 100 µl de Padrão Interno (amostra, calibrador 2009, controle) em um tubo de hidrólise selável e ajustar o pH para 0,8 - 1,0 usando HCl 2N;

2. Incubar os tubos de hidrólise fechados por 30 min. entre 90 e 100°C em banho-maria ou em bloco de aquecimento, e então resfriar imediatamente.

Extração da amostra

Neutralização:

Adicionar 6,0 ml de Tampão de Neutralização na urina hidrolisada. Uma mudança da cor amarela-amarronzada para roxa deve ocorrer agora (esta mudança indica que o valor do pH está ajustado corretamente para a próxima etapa de extração).

Se as amostras não alterarem sua cor para roxa, elas foram fortemente acidificadas na etapa anterior de hidrólise. Nestes casos, adicione NaOH 2N, gota a gota, até que ocorra a mudança de cor.

Extração:

1. Misture brevemente (ressuspenda) e identifique a coluna de preparo de amostras para cada amostra. Remova a tampa da coluna, e rompa o bico de vedação. Permita que o reagente de Equilíbrio flua completamente.
2. Aplique toda a amostra de urina neutralizada na coluna de preparo e descarte o eluato.
3. Lavar a coluna de preparo como a seguir, movendo a cama de resina o mínimo possível:
 - i. 10 ml de água ultrapura (grau HPLC)
 - ii. 5 ml de Tampão de Lavagem
4. Descarte cada eluato.

Eluição:

1. Coloque a coluna de preparo de amostras em um tubo de teste identificados, adicione 5 ml do Tampão de Eluição, e colete o eluato.
2. Misture cada eluato brevemente.

Análise no HPLC:

1. Acidifique o eluato com 150 µl de ácido acético glacial (30 µl por ml de eluato)
2. Injete 20 µl do eluato acidificado no sistema de HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos (fluxo de 1 ml/min)
Normetanefrina	5.5
Metanefrina	7.0
Padrão Interno (HMBA)	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 ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{amostra}

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = C_{calibrador}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS_{calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador = C_{calibrador}

*Concentração de metanefrinas no padrão de calibração líquido após o procedimento de preparo de amostras (art. 2023):

Analito	Concentração	
Normetanefrina	250 µg/l	(1365 nmol/l)
Metanefrina	250 µg/l	(1268 nmol/l)
3-Metoxitiramina	250 - 350 µg/l	(1495-2093 nmol/l)
Padrão Interno (HMBA)	1	

*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

Linearidade / limite de quantificação:

O método é considerado linear a partir do limite inferior de quantificação até a concentração indicada.

Analito	Limite de quantificação [µg/l] aprox.*	Faixa linear de até pelo menos [µg/l]
Normetanefrina	5	2500
Metanefrina	11	5000
3-Metoxitiramina	10	5000

*O limite de quantificação depende das condições do eletrodo de trabalho.

Em altas concentrações, um volume menor de amostras (10 µl) devem ser escolhidos para evitar sobrecarga do detector.

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada pela inclinação das curvas de calibrações de amostra de urina fortificadas e soluções padrões diluídas:

Analito	Recuperação
Normetanefrina	94%
Metanefrina	97%
3-Metoxitiramina	95%
Padrão Interno (HMBA)	96%

As amostras de urina com concentrações de sal muito altas, e aquelas que foram fortemente acidificadas na etapa de hidrólise respectivamente podem exibir taxas de recuperação inferiores (aprox. 75%). Nos cálculos essa perda é compensada pela inclusão do padrão interno.

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi feita pelas médias de múltiplos preparos (n = 10) da mesma amostra e determinação dos analitos em três concentrações diferentes:

Analito	CV em % n = 10 (concentração em µg/l)		
	n=10	n=10	n=10
Normetanefrina	1.4 (325)	0.8 (968)	1.0 (708)
Metanefrina	1.0 (189)	0.9 (362)	2.7 (275)
3-Metoxitiramina	2.1 (164)	0.9 (357)	1.8 (264)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos e da determinação das concentrações de normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina em pool de urina (níveis normal e patológico) em 10 séries diferentes de testes.

Analito	CV em % (concentração em µg/l)	
	n=100	n=100
Normetanefrina	2.7 (351)	1.7 (1427)
Metanefrina	2.4 (170)	2.6 (1206)
3-Metoxitiramina	4.4 (153)	3.5 (1276)

INTERFERENTES CONHECIDOS

O 4-hidroxi-3-metoxi-benzilamina (HMBA), usado como padrão interno, é uma substância de ocorrência natural. Normalmente sua concentração na urina não é detectável e, portanto, não influencia a análise.

A capsaicina, um ácido graxo do HMBA, causa a sensação de calor da pimenta. É também um ingrediente do curry. Dependendo dos hábitos nutricionais a concentração na urina do HMBA pode estar aumentada em quantidades detectáveis então o padrão interno é quantificado falsamente alto com resultados subestimados de normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina.

Neste caso é recomendado o uso do padrão interno alternativo (padrão interno/HR, artigo 2044/HR). A preparação da amostra e a análise em HPLC permanecem o mesmo, mas o tempo de corrida é estendido para aproximadamente 18 minutos

VALORES DE REFERÊNCIA

Os níveis de referência dependem da técnica de análise empregada e da população examinada. Geralmente em pacientes hipertensos é observada uma maior excreção de metanefrinas do que em indivíduos saudáveis. No Instituto de Química Clínica do Hospital da Universidade de Monique, o prof. Jacob analisou amostras de pacientes (urinas de 24h) por HPLC durante muitos anos e encontrou os seguintes valores de referência:

Normetanefrina: até 800 µg/24h (até 4.4 µmol/24h)
Metanefrina: até 400 µg/24h (até 2.0 µmol/24h)

No âmbito deste estudo, 100 pacientes com feocromocitoma puderam ser identificados, e o diagnóstico foi confirmado histologicamente depois de ser sugerido.

Se indivíduos saudáveis são considerados como população de referência, valores mais baixos serão obtidos. (L. Thomas, Labor und Diagnose, 6. Aufl., TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2005):

Normetanefrina: até 390 µg/24h (até 1.95 µmol/24h)*
Metanefrina: até 320 µg/24h (até 1.52 µmol/24h)*

*na literatura citada há um erro no fator de conversão, deverá ser lido:

Normetanefrina: até 2.13 µmol/24h
Metanefrina: até 1.62 µmol/24h

Esses valores foram determinados com métodos analíticos diferentes (HPLC, RIA, TLC).

LITERATURA

1. Lenz T, Gossman 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.
7. Van Duinen N, Steenvoorden D, Kema IP, Janssen JC, Vriends AH, Bayley JP, Smit JW, Romijn JA, Corssmit EP. (2010) Increased urinary excretion of 3-methoxytyramine in patients with head and neck paragangliomas. J Clin Endocrinol Metab 95(1): 209-14.

Símbolos Usados

	Fabricante
	Limites de temperatura
	Diagnóstico in vitro
	Cuidado, consulte documentos anexos
	Consulte instruções de uso
	Material Reciclável
	Não rejeitar diretamente para o ambiente
	Lote
	Data de Fabricação
	Validade
	Risco Biológico
	Altamente tóxico
	Corrosivo
	Nocivo

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: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

www.biosys.com.br