



**ERRECI**

STRUMENTAZIONE SCIENTIFICA E ANALITICA

VENDITA E ASSISTENZA TECNICA

[www.erreci-tech.it](http://www.erreci-tech.it)

# **METANEFINE**

## **IN CAMPIONI DI URINA**

### **RIVELATORE FLUORESCENZA**

**MANUALE D'USO UTENTE**  
**KIT PER HPLC PRONTO ALL'USO**  
**RC-MNU-K00100**  
**V. 1.0**

## INTRODUZIONE

Le ammine biogeniche (normetanefrina, metanefrina e 3-metossitiramina), metaboliti principali delle catecolamine, sono parametri importanti nella diagnosi di tumori come il feocromocitoma, il neuroblastoma, il ganglioneuroma e il melanoblastoma. La loro determinazione, accanto a quella di noradrenalina, dopamina, VMA e HVA, permette di ridurre l'incidenza di falsi positivi. Grazie alla rivelazione con detector a fluorescenza il cromatogramma è privo di interferenze da tiramina, sinefrina e octopamina.

## PRINCIPIO DEL KIT

I campioni di urina sono addizionati degli opportuni reagenti, idrolizzati, purificati con cartucce di estrazione e in seguito iniettati nel sistema HPLC con detector a Fluorescenza.

## CARATTERISTICHE STRUMENTAZIONE HPLC

Si utilizza un sistema HPLC isocratico costituito da una pompa, un iniettore e un detector Fluorimetrico. E' consigliato l'uso di fornetti capaci di termostatare la Temperatura della colonna a +30 °C (Peltier). Questi assicurano un'ottima stabilità e riproducibilità della separazione cromatografia. Assicurarsi comunque di rendere il più possibile stabile la temperatura della stanza in cui è presente il sistema HPLC.

### CONFIGURAZIONI STRUMENTALI

- |                             |                                                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| • Volume di iniezione       | 20 µl                                                |
| • Flusso pompa HPLC         | Vedi gradiente allegato alla colonna                 |
| • Temperatura della colonna | +30°C                                                |
| • Detector Fluorimetrico    | λ eccitazione (ex) 280 nm<br>λ emissione (em) 315 nm |

### COLONNA HPLC

La colonna per l'analisi delle metanefrine urinarie viene fornita equilibrata, testata e pronta all'uso. Innalzare il flusso a quello di lavoro in alcuni minuti. Equilibrare il sistema per almeno 15-20 min. fino a stabilizzazione della linea di base.

### **NON METTERE IN RICIRCOLO LA FASE MOBILE**

**La fase mobile deve essere conservata a temperature non superiori ai +25-27 °C e ben tappata.**

### INATTIVITÀ DEL SISTEMA

Sia per periodi brevi di inattività che in caso di disconnessione la colonna deve essere lasciata nella fase mobile B.

## SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

La separazione cromatografia richiede circa 25/30 min.

Variazione dei tempi di ritenzione possono essere dovute a fluttuazioni della T° o ad iniezioni in condizioni di non equilibrio. Si consiglia di iniettare lo standard di calibrazione più volte fino a che i tempi di ritenzione non risultino stabili.

**N.B.:** Le fasi mobili, gli eventuali calibratori e controlli (in caso siano necessari) sono già inclusi nei kit e sono calcolati per sessioni di lavoro che prevedono 10 iniezioni (leggere attentamente le istruzioni riportate nel kit per un corretto utilizzo), tuttavia sono fornibili a parte qualora necessario.

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

### Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni sono costituiti da urina raccolta nelle 24 h in contenitore scuro e contenente 20 ml di acido cloridrico 6 N. Questi, o comunque aliquote raccolte in contenitori che li proteggano dalla luce, possono essere conservati a 4 °C per 1 settimana.

### Soluzioni standard di riferimento

Con il kit è fornita la soluzione standard di calibrazione. Leggere attentamente il documento allegato al flacone dove sono riportate le istruzioni per la ricostituzione e le concentrazioni degli analiti.

Per la conservazione del calibratore dopo la ricostituzione aliquotare in cuvette di PoliPropilene e congelare a -20 °C. Trattare poi queste come un normale campione.

### Trattamento dei campioni e della soluzione standard di calibrazione

Seguire le istruzioni di ricostituzione dello STD (Cod. **RC-MNU-SC0100**) pagina successiva punto 3 "Urine Calibrator Method".

**Lo Standard di calibrazione ed il Controllo vengono sottoposti alla stessa procedura di preparazione del campione.**

In una provetta di vetro munita di tappo, aggiungere nell'ordine:

- 100 µL della soluzione di **campione o standard di calibrazione (cod. RC-MNU-SC0100)**
- 100 µL della soluzione dello **standard interno (cod. RC-MNU-SI0100)**

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Tappare ed idrolizzare per 40 minuti a +100 °C.
- Raffreddare ad aria ed aggiungere 1 ml di Reagente C (Cod. RC-MNU-RC0100) e 100 µL di reagente D (cod. RC-MNU-RD0100).
- Tappare e scaldare a +100 °C per altri 2 minuti.
- Raffreddare a T° ambiente.

### Attivazione della cartuccia

- Attivare la cartuccia di estrazione con 1 mL di Reagente A (Cod. RC-MNU-RA0100).
- Non portare a secco, attendere che il liquido tocchi la superficie del filtro sovrastante la fase stazionaria ed aggiungere 1 mL di reagente B (cod. RC-MNU-RB0100)
- Lasciare eluire fino a completa eluizione..
- Applicare il campione preparato come descritto al paragrafo 3.
- Lasciare eluire lentamente ed alla fine applicare un vuoto sufficiente ad asciugare bene la cartuccia.
- Scartare l'eluato.

### Lavaggio

- Lavare la cartuccia di estrazione preparata al punto precedente:
- **1000 µL (1 ml)** del Reagente B (RC-MNU-RB0100)
- Al termine applicare un vuoto sufficiente ad asciugare bene la cartuccia, scartare l'eluato.

### Eluizione

- Collocare sotto la cartuccia di estrazione delle provette in PP ed aggiungere:
- **600 µL (0,6 ml)** del Reagente E (RC-MNU-RE0100)
- Al termine applicare un vuoto sufficiente ad asciugare bene la cartuccia, scartare l'eluato.
- Collocare sotto la cartuccia di estrazione delle provette in PP ed aggiungere:
- Far scendere il liquido lentamente ed alla fine applicare una pressione sufficiente ad asciugare bene la cartuccia, raccogliere questo eluato.
- Iniettare nel sistema HPLC 20 µL dell'eluato raccolto al punto precedente

### Conservazione dei campioni trattati

Se non immediatamente analizzati i campioni, preparati come sopra descritto, possono essere conservati a 4 °C, ben tappati ed al riparo dalla luce, per 24 ore.

## VALORI DI RIFERIMENTO

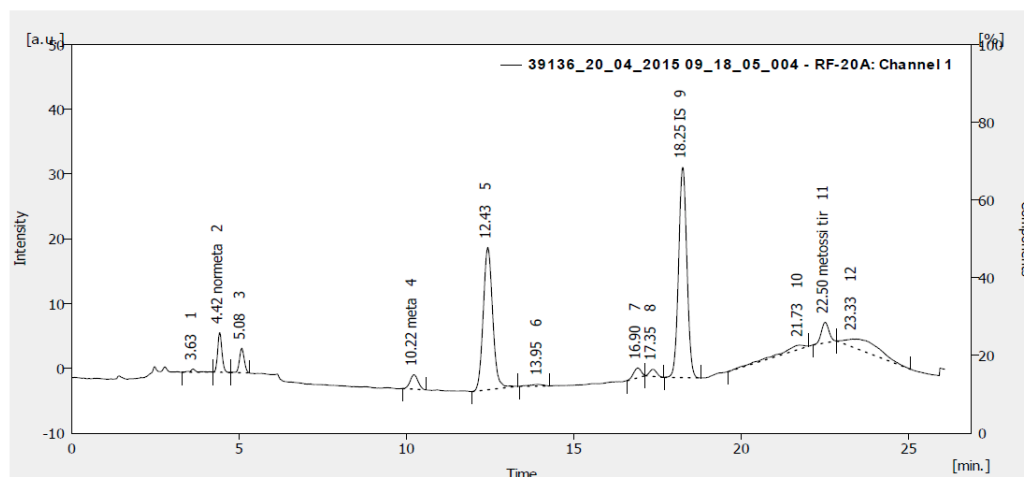
normetanefrina  
metanefrina

inferiore a 560 µg/24 h  
inferiore a 240 µg/24 h

## DISPOSIZIONE DELLO SCARICO

La fase mobile ed i campioni derivatizzati devono essere raccolti in apposito contenitore da dedicare allo stoccaggio di solventi organici privi di alogeni.

## CROMATOGRAMMA DELLO STANDARD DI TARATURA



Result Table (ISTD - 39136\_20\_04\_2015 09\_18\_05\_004 - RF-20A: Channel 1)

|       | Reten. Time [min] | Area [a.u.s] | Amount [µg/24h] | Compound Name | Correction Factor |
|-------|-------------------|--------------|-----------------|---------------|-------------------|
| 2     | 4.417             | 54.430       | 235.3           | normeta       | 1.000             |
| 4     | 10.217            | 37.240       | 149.2           | meta          | 1.000             |
| 9     | 18.250            | 560.560      | ISTD            | IS            | 1.000             |
| 11    | 22.500            | 50.110       | 189.3           | metossi tir   | 1.000             |
| Total |                   | 141.780      | 573.8           |               |                   |

**INFORMAZIONI PER ORDINARE**

| Codice        | Prodotto                                                                                   | Quantità |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| RC-MNU-K00100 | Kit di reagenti per 100 analisi di Metanefrine nelle urine con tecnica HPLC e detector FL. | 100      |

**Componenti del kit disponibili separatamente**

|               |                            |          |
|---------------|----------------------------|----------|
| RC-MNU-FMA100 | Fase mobile A              | 2x500 mL |
| RC-MNU-FMB100 | Fase mobile B              | 1x500 mL |
| RC-MNU-SC0100 | Standard di calibrazione   | 1 fl     |
| RC-MNU-CE0100 | Cartucce di estrazione     | 100 pz   |
| RC-MNU-SI0100 | Soluzione standard interno | 250 mL   |
| RC-MNU-RA0100 | Reagente A                 | 80 mL    |
| RC-MNU-RB0100 | Reagente B                 | 240 mL   |
| RC-MNU-RC0100 | Reagente C                 | 40 mL    |
| RC-MNU-RD0100 | Reagente D                 | 5 mL     |
| RC-MNU-RE0100 | Reagente E                 | 20 mL    |

**Accessori per lo start-up**

|               |                               |      |
|---------------|-------------------------------|------|
| RC-WSC-CA1000 | Colonna equilibrata e testata | 1 pz |
|---------------|-------------------------------|------|

**N.B.:** Le fasi mobili, gli eventuali calibratori e controlli (in caso siano necessari) sono già inclusi nei kit e sono calcolati per sessioni di lavoro che prevedono 10 iniezioni (leggere attentamente le istruzioni riportate nel kit per un corretto utilizzo), tuttavia sono fornibili a parte qualora necessario.