

# 17-KETOSTEROIDS

Determinazione Cromatografico – Colorimetrica  
dei 17-Chetosteroidi nelle Urine

20 test

REF KR04-20

## USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* dei 17-Chetosteroidi nelle urine.

## PRINCIPIO DI REAZIONE

Dopo idrolisi acida i 17-chetosteroidi vengono adsorbiti su una resina neutra. Allontanate con un semplice lavaggio le sostanze interferenti, i 17-chetosteroidi vengono eluiti e determinati quantitativamente mediante la reazione di Zimmermann.

## REAGENTI E COLONNE

Composizione del kit:

*REAGENT 1 Esametilentetramina	1 x 1.5 ml
*REAGENT 2 Alcalinizzante	2 x 60 ml
*REAGENT 3 Eluente alcolico (conservare ben chiuso)	1 x 65 ml
*REAGENT 4 Cromogeno (polvere)	1 flaconi
*REAGENT 5 Alcalinizzante	1 x 30 ml
*REAGENT 6 Soluzione estraente (conservare ben chiuso)	1 x 75 ml
STANDARD Deidroepiandrosterone 1 g/L	1 x 1 ml
COLUMN Colonne cromatografiche	20

(\*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITA': i reagenti e materiali sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

## STRUMENTAZIONE NECESSARIA E NON FORNITA

Spettrofotometro o fotometro a filtri (520 nm)

Centrifuga, bagno termostatico 25-100°C.

## PREPARAZIONE DEL REAGENTE 4

Ad un flacone di Reagent 4 aggiungere 15 ml esatti di Reagent 3. Agitare delicatamente fino a completa solubilizzazione.

STABILITA': almeno 2 mesi a 2-8°C.

## CAMPIONE

Urine delle 24 ore.

Raccogliere le urine delle 24 ore in un recipiente contenente 3-4 ml di acido cloridrico concentrato. Controllare che il valore del pH sia compreso tra 3 e 6. Mescolare le urine, misurarne il volume e conservarle a 2-8°C.

Centrifugare o filtrare prima di eseguire il test.

STABILITA': almeno 7 giorni a 2-8°C.

## PROCEDIMENTO MANUALE

Lunghezza d'onda:	520 nm
Cammino ottico:	1 cm
Lettura:	contro bianco
Temperatura:	4 o 25°C
Linearità:	180 mg/L
Sensibilità:	0.8 mg/L
Recupero:	90 ± 2 %
C.V.:	0.9 %

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Pipettare in provette contraddistinte:

	Campione	Bianco
Urina	2.5 ml	-----
Acqua distillata	-----	2.5 ml
Acido cloridrico concentrato	0.5 ml	0.5 ml
Reagent 1	1 goccia (50 µl)	1 goccia (50 µl)

Mescolare e immergere le provette in bagnomaria bollente per 10 minuti. Raffreddare le provette con acqua corrente.

## PREPARAZIONE DELLA COLONNA

Togliere il tappo superiore e quindi spezzare la lancetta di chiusura inferiore della colonna. Lasciare defluire completamente il liquido.

## SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Trasferire in una colonnina il contenuto della provetta CAMPIONE, e nella colonnina contrassegnata BIANCO COLONNA il contenuto della provetta BIANCO.

Lasciare eluire completamente il liquido. Pipettare nelle colonne:

	Campione	Bianco Colonna	
Acqua distillata	1.0 ml	1.0 ml	
Reagent 2	5.0 ml	5.0 ml	scartare l'eluato
Acqua distillata	1.0 ml	1.0 ml	scartare l'eluato
Reagent 3	2.0 ml	2.0 ml	raccogliere l'eluato

Mescolare con cura l'eluato raccolto. STABILITA': almeno 24 ore a 2-8°C.

## REAZIONE COLORIMETRICA

Pipettare in provette da centrifuga con tappo contraddistinte:

	Campione	Standard	Bianco Colonna	Bianco Reagente
Eluato CAMPIONE	1.0 ml	----	----	----
Eluato Bianco Colonna	----	----	1.0 ml	----
Standard	----	25 µl	----	----
Reagent 3	----	1.0 ml	----	1.0 ml
Reagente 4	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reagent 5	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mescolare con cura. Tappare le provette e porle ad incubare a 4°C per 60 minuti, o a 25°C per 25 minuti. Aggiungere:

Reagent 6	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
-----------	--------	--------	--------	--------

Mescolare bene e centrifugare a 3000 rpm per 5 minuti. Leggere l'assorbanza della fase superiore del campione (Ac), del Bianco Colonna (Abc) e dello standard (Ast) a 520 nm azzerando contro il Bianco Reagente.

## CALCOLO

17-chetosteroidi (mg/L)=[(Ac-Abc) / Ast] x 20

17-chetosteroidi (mg/24 ore)= mg 17-chetosteroidi/L x L urina 24 h

## VALORI DI RIFERIMENTO

Valori espressi in mg/litri di urina delle 24 ore

Età in anni	Uomini	Donne
0 - 6	0 - 2.3	0 - 2.2
6 - 10	1.1 - 5.6	0.9 - 4.5
11	3.9 - 6.5	2.9 - 8.9
12	4.5 - 7.3	3.3 - 11.5
13	4.8 - 8.0	4.8 - 12.6
14	5.3 - 9.0	4.8 - 13.4
15 - 16	7.6 - 11.0	8.2 - 14.2
17	10.8 - 14.5	10.7 - 15.3
18	10.8 - 17.0	12.0 - 17.0
19	10.9 - 20.0	13.2 - 17.9
20 - 25	15.6 - 23.4	14.0 - 18.8
25 - 40	17.0 - 25.0	11.0 - 19.0
40 - 50	11.4 - 22.0	10.0 - 19.0
50 - 60	9.0 - 18.0	7.3 - 16.8
60 - 70	5.8 - 13.5	5.5 - 13.4
70 - 80	2.9 - 10.0	3.2 - 10.9
oltre 80	2.7 - 8.0	1.8 - 5.8

## OSSERVAZIONI

1. Contrassegnare una delle colonnine con etichetta BIANCO COLONNA. Tale colonnina servirà a preparare i Bianchi e può essere riutilizzata più volte, avendo l'accortezza di conservarla dopo l'uso con il letto di resina coperto di acqua distillata.
2. Lo sviluppo del colore a 4°C è preferibile, in quanto si ottengono risultati più accurati per la ridotta formazione di interferenti.
3. E' opportuno non ritardare la lettura oltre i 30 minuti dall'aggiunta del Reagent 6.
4. Se la fase superiore apparisse torbida dopo la centrifugazione, occorre trasferirla in un tubo da centrifuga contenente una punta di spatola di sodio solfato anidro, agitare bene e lasciare depositare.
5. Le quantità di reagente fornite sono sufficienti per effettuare 25 test (19 campioni, 2 standard, 2 bianco reagente e 2 bianco colonna).
6. I volumi di reazione possono essere variati rispettando le proporzioni.
7. Se le urine idrolizzate presentano un'elevata quantità di precipitato, centrifugare le urine prima di trasferire l'idrolizzato nelle colonnine. Recuperare attentamente tutto il surnatante idrolizzato e trasferirlo nelle colonnine.

## BIBLIOGRAFIA

1. R.A. Richardson, Clin.Chim.Acta,50 (1974), 151-152
2. W. Zimmermann, "Z. Physiol. Chem.", 233, 257 (1935)



Edizione 01 - Nov 2021



FAR srl

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

Tel. +39 045 6700870 - Fax +39 045 7157763

sito web: <http://www.farddiag.com> e-mail: [farddiag@farddiag.com](mailto:farddiag@farddiag.com)