

METANEPHRINES

Determinazione Cromatografico – Spettrofotometrica
delle Metanefrine
nelle Urine

20 test

REF KR08-20

USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* delle Metanefrine nelle urine.

PRINCIPIO DI REAZIONE

Le metanefrine sono adsorbite su una resina cationica. Dopo lavaggio delle sostanze interferenti, esse vengono eluite e determinate per via spettrofotometrica mediante ossidazione a vanillina.

REAGENTI E COLONNE

Composizione del kit:

REF KR08-20

REAGENT 1 EDTA **1 flacone**

***REAGENT 2** Alcalinizzante **1 x 40 ml**

***REAGENT 3 Standard** di metanefrina 100 mg/L **1 x 2 ml**

REAGENT 4 Tampone **1 x 85 ml**

AVVERTENZA: nel caso fosse presente un deposito sul fondo del flacone, agitare fino a solubilizzazione completa mantenendo la temperatura intorno ai 20-25°C.

***REAGENT 5** Eluente **1 x 90 ml**

***REAGENT 6** Agente ossidante (polvere) **1 flacone**

***REAGENT 7** Agente riducente (polvere) **1 flacone**

COLUMN Colonne cromatografiche **20**

MEASURE Misurino per Reagent 1 **1**

STABILITÀ: i reagenti sigillati e le colonne sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

STRUMENTAZIONE NECESSARIA E NON FORNITA

- Bagno termostatico
- Spettrofotometro o fotometro a filtri a 360 nm

PREPARAZIONE DEI REAGENTI DI LAVORO

REAGENTE 6

Sciogliere il contenuto di un flacone di Reagent 6 con 6 ml di acqua distillata. Agitare fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: almeno 5 mesi a 2-8°C. Conservare ben chiuso.

REAGENTE 7

Sciogliere il contenuto di un flacone di Reagent 7 con 6 ml di acqua distillata. Agitare fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: almeno 5 mesi a 2-8°C. Conservare ben chiuso.

CAMPIONE

Urine delle 24 ore. Raccogliere le urine, misurarne il volume e aggiustare il pH a circa 0.7-0.9 con HCl concentrato. Conservare al buio a 2-8°C. Centrifugare o filtrare l'urina prima di eseguire il test. **STABILITÀ:** una settimana a 2-8°C.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda:	360 nm
Cammino ottico:	1 cm
Lettura:	contro bianco reagente
Temperatura	20-25°C
Metodo	spettrofotometrico
Linearità	20 mg/L
Sensibilità	0.4 mg/L
C.V.:	< 8 %

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Pipettare in una provetta:

Campione	2.5 ml	
----------	--------	--

Incubare la provetta in bagnomaria bollente per 20 minuti, successivamente raffreddare sotto acqua corrente e versare il contenuto in un beaker da 10 ml. Aggiungere:

Reagent 1	1 misurino raso	
-----------	-----------------	--

Mescolare per favorire la solubilizzazione del Reagent 1.

Portare il pH a 6.5 con il Reagent 2, aggiungendo goccia a goccia e mescolando continuamente.

Centrifugare a 3000xg per 5 minuti.

PREPARAZIONE DELLA COLONNA

Agitare le colonne fino a completa risospensione della resina, quindi lasciarle in posizione verticale per alcuni minuti attendendo che la resina sedimenti nuovamente. Togliere il tappo superiore e quindi spezzare la lancetta di chiusura inferiore della colonna. Lasciare defluire completamente il liquido. Lavare ciascuna colonna pipettando 5 ml di acqua distillata per rimuovere la soluzione tampone. Lasciare defluire completamente il liquido.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Trasferire poco per volta il supernatante del campione in una colonna contraddistinta. Scartare l'eluato.

Aggiungere in ciascuna colonna:

Acqua distillata	5.0 ml	scartare l'eluato
Reagent 4	4.0 ml	scartare l'eluato
Acqua distillata	5.0 ml	scartare l'eluato

Porre la colonna su una provetta della capacità di 15-20 ml ed eluire nel modo seguente:

Reagent 5	4.0 ml	raccogliere l'eluato
-----------	--------	----------------------

Mescolare con cura l'eluato raccolto. Poiché le metanefrine non sono stabili al pH dell'eluato, è molto importante effettuare subito la reazione colorimetrica.

REAZIONE COLORIMETRICA

Contrassegnare una serie di provette: Br: Bianco reagente; C: Campione; Bc: Bianco Campione; St: Standard; Bst: Bianco Standard. Pipettare in provette contraddistinte:

	Br	Bc	C	Bst	St
Eluato C	---	1.9 ml	1.9 ml	---	---
Reagent 5	1.9 ml	---	---	1.8 ml	1.8 ml
Standard (Reagent 3)	---	---	---	0.1 ml	0.1 ml
Reagent 7	---	50 µl	---	50 µl	---

Mescolare con cura e aggiungere:

Reagent 6	50 µl				
-----------	-------	-------	-------	-------	-------

Mescolare con cura e lasciare riposare per 2 minuti a temperatura ambiente, quindi aggiungere:

Reagent 7	50 µl	---	50 µl	---	50 µl
-----------	-------	-----	-------	-----	-------

Mescolare bene e leggere l'assorbanza del campione, dello standard e dei rispettivi bianchi a 360 nm azzerando contro il bianco reagente.

CALCOLO

Metanefrine (mg/L) = $[(AC - ABc)/(ASt - ABst)] \times 8.42$

Metanefrine (mg/24 ore) = mg metanefrine/L x L di urine 24 ore

VALORI DI RIFERIMENTO

Urine delle 24 ore: < 1 mg/24 h

È opportuno che ciascun laboratorio determini i propri intervalli di normalità.

BIBLIOGRAFIA

1. L. Peyrin et R. Mornex, Pathol. Biol. 16 (7-8), 447-455 (1968)



Edizione 01 - Novr 2021



Prodotto da: 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