

МЕТАНЕФРИНЫ PISANO

| |
|--|
| КОД 11022 40 определений |
| Хранить при 15-30° С |
| Использовать только для работы «in vitro» в клинических лабораториях |

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метанефрины удерживаются катионно-обменной смолой и после промывания побочных субстанций элюируются. Метанефрины определяются количественно спектрофотометрически, как ванилин после окисления перийодатом в щелочной среде¹.

СОСТАВ

1 Реагент. 1 x 225 мл. Двойной трис-буфер 0,4 моль/л, ЭДТА натрия 2,7 ммоль/л, консервант.

2 Реагент. 1 x 400 мл, Аммиак 4 моль/л.
Раздражающий (Xi): R36/37/38: Вызывает раздражение при контакте с глазами, вдыхании и контакте с кожей. S26: При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. R36/37/39: пользуйтесь защитной одеждой, перчатками и защитой глаз/лица.

S45: При несчастном случае или плохом самочувствии немедленно обратитесь за медицинской помощью (при работе с набором необходимо наличие предупреждающих надписей).

3 Микроколонки 2x20. Содержат предварительно взвешенное количество смолы в буфере.

А Реагент. 2 для 10 мл. Порошок m-перийодат натрия 0,12 моль/л, после разведения.

Окислитель (O): При контакте с горючими материалами может вызвать возгорание.

В Реагент. 2 для 10 мл. Порошок метабисульфита натрия 0,67 моль/л, после разведения.
Вредный (Xn): R22: опасен при глотании. R31: При контакте с кислотами вызывает высвобождение токсичного газа. R41: Опасность серьезного повреждения глаз. S26: При попадании в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. R39: Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками и защитой глаз/лица.

S46: При проглатывании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

S Стандарт. 2 x 5 мл. Норметанефрин 100 мг/л = 550 мкмоль/л в соляной кислоте 0,1 моль/л. Первичный водный стандарт.

ХРАНЕНИЕ

Хранить при 15-30° С.

Реагенты и стандарт стабильны до срока годности, указанного на этикетке флакона при хранении плотно закрытыми и без загрязнения их во время пользования. Показатели загрязнения:

- Реагентов: Присутствие осадка, взвешенных частиц и помутнение, абсорбция бланка реагента свыше 0,060 при 360 нм (1 см кювета)
- Микроколонки: Отсутствие буфера над верхним фильтром

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ

- Концентрированная соляная кислота (ч.д.а)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА

Реагент А и В. Развести сухой порошок в 10 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен 5 месяцев при 2 – 8° С.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 360 нм (358 – 362).
- Кипящая водяная баня

ОБРАЗЦЫ

Моча. Суточная моча, собранная по стандартной процедуре.

Борная кислота не приемлема в качестве консерванта! Хранить образцы при 2 – 8° С и использовать в течение 24 часов. Образцы могут храниться при 2 – 8° С максимально в течение 15 дней и при -20° С в течение 1 месяца при доведении рН ниже 3 раствором концентрированной соляной кислоты (HCl). Перед тестированием мочу следует отцентрифугировать или профильтровать.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка образца

1. Внести в пробирку:

| | |
|---------|--------|
| Образец | 5,0 мл |
|---------|--------|

2. Довести рН до 0,7 – 0,9 концентрированной соляной кислотой.
3. Инкубировать в кипящей бане в течение 20 минут. Остудить под проточной водой. Затем добавить:

| | |
|-------------|--------|
| Реагент (1) | 5,0 мл |
|-------------|--------|

Хроматографическое разделение

4. Снять верхнюю крышку с колонки (3) и затем открыть нижнюю часть колонки. Протолкнуть верхний диск и дать ему опуститься на смолу, не оказывая давления. Дать колонке полностью стечь.
5. Внести содержимое пробирки (подготовленный образец) в микроколонку. Дать колонке полностью стечь.

- Промыть пробирку 2 – 3 мл дистиллированной воды и вылить в колонку. Дать колонке полностью стечь.
- Добавить в каждую колонку:

| | | |
|-----------------------|---------|--------------------|
| Дистиллированная вода | 10,0 мл | Дать колонке стечь |
| Реагент (2) | 7,5 мл | Собрать элюат |

- Тщательно перемешать элюат (примечание 2).

Колориметрия

- Налить в соответственно промаркированные пробирки:

| | Реагент бланк | Стандарт бланк | Стандарт | Образец бланк | Образец |
|--------------|------------------|-------------------|----------|------------------|---------|
| Элюат | - | - | - | 2 мл | 2 мл |
| Стандарт (S) | - | 0,1 мл | 0,1 мл | - | - |
| Реагент (2) | 2 мл | 1,9 мл | 1,9 мл | - | - |
| Реагент (B) | - | 0,05 мл | - | 0,05 мл | - |

- Тщательно перемешать и затем добавить:

| | | | | | |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Реагент (A) | 0,05 мл | 0,05 мл | 0,05 мл | 0,05 мл | 0,05 мл |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|

- Тщательно перемешать и оставить стоять при комнатной температуре (15 - 30° C) на 2 минуты, затем добавить:

| | | | | | |
|-------------|---------|---|---------|---|---------|
| Реагент (B) | 0,05 мл | - | 0,05 мл | - | 0,05 мл |
|-------------|---------|---|---------|---|---------|

- Перемешать и измерить абсорбцию (A) образца, Стандарта, и соответствующих бланков против Бланка реагента при 360 нм. Абсорбция стабильна в течение не менее 60 минут.

РАСЧЕТ

Расчет концентрации метанефринов может быть произведен по следующей общей формуле:

$$\frac{A_{\text{обр}} - A_{\text{обр. бланк}}}{A_{\text{ст}} - A_{\text{ст. бланк}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{STC}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{C_{\text{ST}} \times \text{Rec}} = C_{\text{обр}}$$

Принимая во внимание, что (VS) 5 мл, объем элюата (VE) 7,5 мл, объем элюата в колориметрии (VEC) 2 мл, объем стандарта в колориметрии (VST) 0,1 мл, концентрация стандарта (CST) 100 мг/л или 550 мкмоль/л, и средняя воспроизводимость (Rec) 0,98, можно использовать для расчета следующую сокращенную формулу расчета концентрации:

| | |
|---|--|
| $\frac{A_{\text{обр}} - A_{\text{обр. бланк}}}{A_{\text{ст}} - A_{\text{ст. бланк}}}$ | $\times 7,65 = \text{мг/л метанефринов}$ |
| | $\times 42,1 = \text{мкмоль/л метанефринов}$ |

Количество метанефринов в суточной моче рассчитывается по следующей общей формуле:

| | | |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| мг/л метанефринов | $\times V_{\text{мочи/24 часа}} (\text{л}) =$ | мг/л метанефринов/24 часа |
| мкмоль/л метанефринов | | мкмоль/л метанефринов/24 часа |

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Моча²: До 1 мг/ 24- час.= до 5.5 мкмоль/24-час.

Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать Контрольную мочу (код 18036, 18037) для верификации измерительных процедур

Каждая лаборатория должна выработать собственную схему внутреннего контроля качества и процедуры для коррекции действий в случае, если контроль качества не укладывается в приемлемые диапазоны.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Линейность: не менее 30,9 мг/л = 170 мкмоль/л
- Нижний предел определения: 0.2 мг/л = 1,1 мкмоль/л
- Сходимость (внутри серии):

| Средняя концентрация | CV | n |
|------------------------|------|----|
| 0,3 мг/л=1,5 мкмоль/л | 9,8% | 25 |
| 3,8 мг/л=21,2 мкмоль/л | 5,6% | 25 |

- Воспроизводимость (между сериями):

| Средняя концентрация | CV | n |
|------------------------|-------|----|
| 0,3 мг/л=1,5 мкмоль/л | 14,8% | 25 |
| 3,8 мг/л=21,2 мкмоль/л | 10,0% | 25 |

- Чувствительность: 63,8 мА• л/мг= 11,6 мА• л/мкмоль.
- Достоверность: Результаты, полученные с данными реагентами не показывали значительных отличий при сравнении с результатами, полученными с другими реагентами. Детали сравнительных экспериментов доступны по требованию.
- Интерференция: Некоторые вещества и лекарства могут исказить результат⁴.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Метанефрин и норметанефрин, определяемые как метанефрины, являются продуктами метаболизма (катаболизма) катехоламинов, определяющимися в моче.

Повышение уровня метанефринов ассоциируется с катехоламин секретирующими опухолями хромаффинных клеток, такими как феохромоцитома, паранганглиома и нейробластома^{4,5,6}.

Клинический диагноз не должен основываться только лишь на результатах единичного теста, а должен устанавливаться на основе как клинических, так и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЕ

- Длительное хранение колонок приводит к уплотнению смолы, снижению скорости протекания колонки и увеличению времени элюции. Чтобы увеличить скорость потока необходимо за 10 минут до начала теста перевернуть колонку для ресуспендирования содержимого и затем дать ей отстояться в нормальном положении в течение нескольких минут для осаждения смолы.
- Немедленно начинайте колориметрическое определение, так как метанефрины нестабильны при данных значениях pH.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Pisano J. A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. *Clin Chem Acta* 1960; 5: 406-414
2. Pesce J.A. and Kaplan L.A. *Methods in Clinical Chemistry*. C.V. Mosby Co, 1987
3. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACC Press, 1995
4. Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3rd ed. AACC Press, 1997
5. Witteles et al. Sensitivity of diagnostic and Localisation Tests for Pheochromocytoma in Clinical Practice. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160: 2521-2524
6. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 3rd ed. Saunders Co, 1999