

Nota Técnica ATSA-2

Autores: Hernán Invenenato (ATBA S.A.), Jorge Rey (ATBA S.A.), José Luis Castiglione (Analytical Technologies S.A.).

Metodología analítica para valoración de catecolaminas en orina humana por HPLC con detector electroquímico

**Introducción**

Las **catecolaminas** son un grupo de sustancias producidas principalmente en las células cromafines de la médula adrenal y en las fibras postganglionares del sistema nervioso que incluye la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina. La adrenalina, la noradrenalina y la dopamina son neurotransmisores en el sistema nervioso central y ejercen efectos metabólicos por estimulación de receptores adrenérgicos en una amplia variedad de células. Por otra parte estas moléculas tienen acciones hormonales y regulatorias sobre distintos órganos y células. La excesiva producción y liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo por una neoplasia de tejido cromafínico, tal como feocromocitoma produce en forma característica, hipertensión persistente o paroxística. El dosaje de catecolaminas urinarias es de interés en el diagnóstico diferencial de la hipertensión persistente o sin otra etiología evidente. Uno de los inconvenientes que presenta el dosaje de catecolaminas urinarias es la sensibilidad requerida para cuantificar las concentraciones halladas en esa matriz biológica

Parte experimental**Metabolitos estudiados:**

Los compuestos analizados en orina fueron Norepinefrina (Noradrenalina, simbolizada como NE) y Epinefrina (Adrenalina, simbolizada como E), como estándar interno se utilizó 3-4 Dihidroxibenzilamina bromhidrato (simbolizado como DHBA).

Método de extracción

Las muestras de orina de 24hs recolectadas sobre medio conservante, fueron extraídas mediante una técnica de adsorción y elusión con alúmina.

Equipamiento

El cromatógrafo está conformado por los siguientes módulos:

Bomba cuaternaria Agilent 1200
Inyector automático Agilent 1200
Compartimiento calefactor de columnas Agilent 1200
Desgasificador por vacío en línea Agilent 1200
Detector electroquímico Coulochem III marca ESA

Condiciones cromatográficas:

Columna: ACE-C18 250x4.6 mm, 5 μ m

Fase móvil: A) Octanosulfonato de Sodio: KH_2PO_4 : K_2EDTA : H_2O (0,2330 g : 6,8 g : 0,1272 g : csp. 1000 ml) $\text{pH}=2,5 \pm 0,1$ con H_3PO_4

B) Octanosulfonato de Sodio: KH_2PO_4 : K_2EDTA : H_2O (0,2330 g : 13,61 g : 0,1272 g : csp. 1000 ml) $\text{pH}=2,5 \pm 0,1$ con H_3PO_4

Gradiente:

Tiempo (min)	% FM A	% FM B
0	100	0
12,0	0	100
35,0	0	100
35,5	100	0
45,0	100	0

Flujo: 1,5 ml/min.

Tiempo de corrida: 50 minutos

Volumen de Inyección: 100 μ l

Detección: ECD marca ESA, 200 mV (1 μ A).

Temperatura: 35°C

Resultados:

En las figura 1 y 2 se pueden observar las curvas de calibración para las dos catecolaminas analizadas, donde se muestran excelentes coeficientes de correlación.

El Límite bajo de cuantificación, que llega a las sub ppb, fue 0,04 µg/l para NE y 0,09 µg /l para E, mostrando la excelente sensibilidad del sistema.

El rango de cuantificación es de 0,04 a 200 µg/l para NE y de 0,09 a 94 µg/l para E.

En las figuras 3, 4 mostramos cromatogramas de patrón y una muestra.

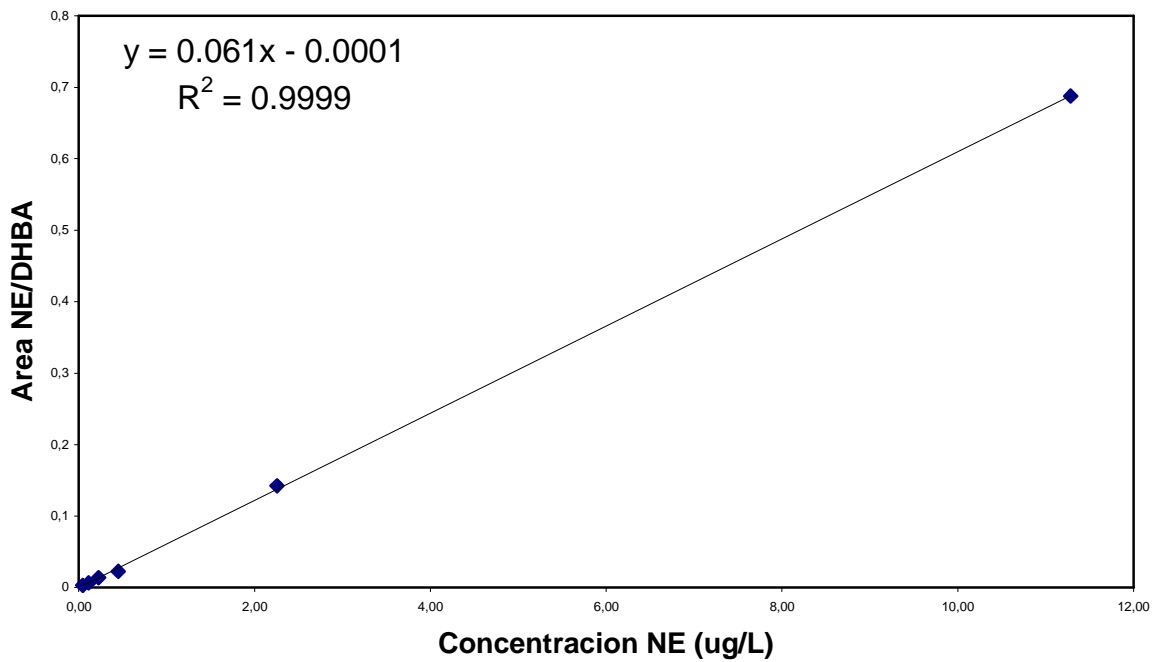


Figura 1: Curva de calibración de Norepinefrina

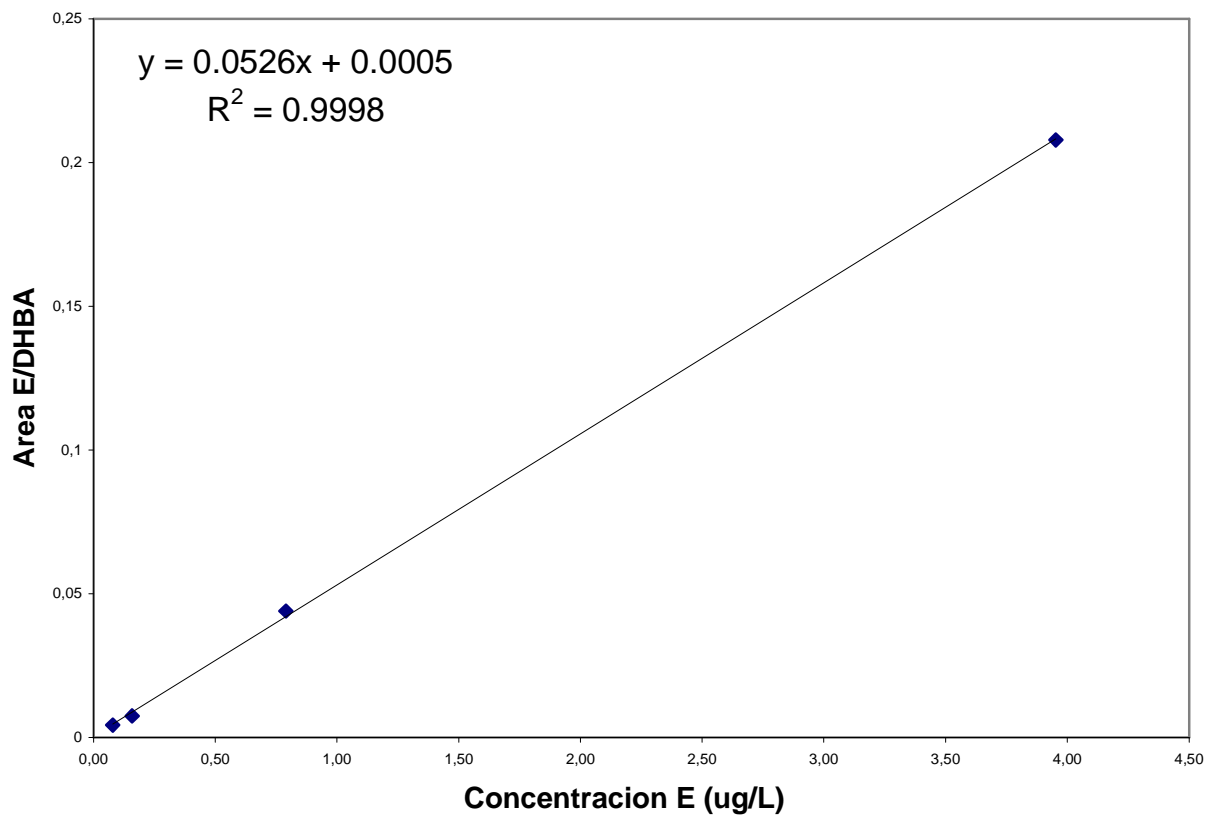


Figura 2 : Curva de calibración de Epinefrina

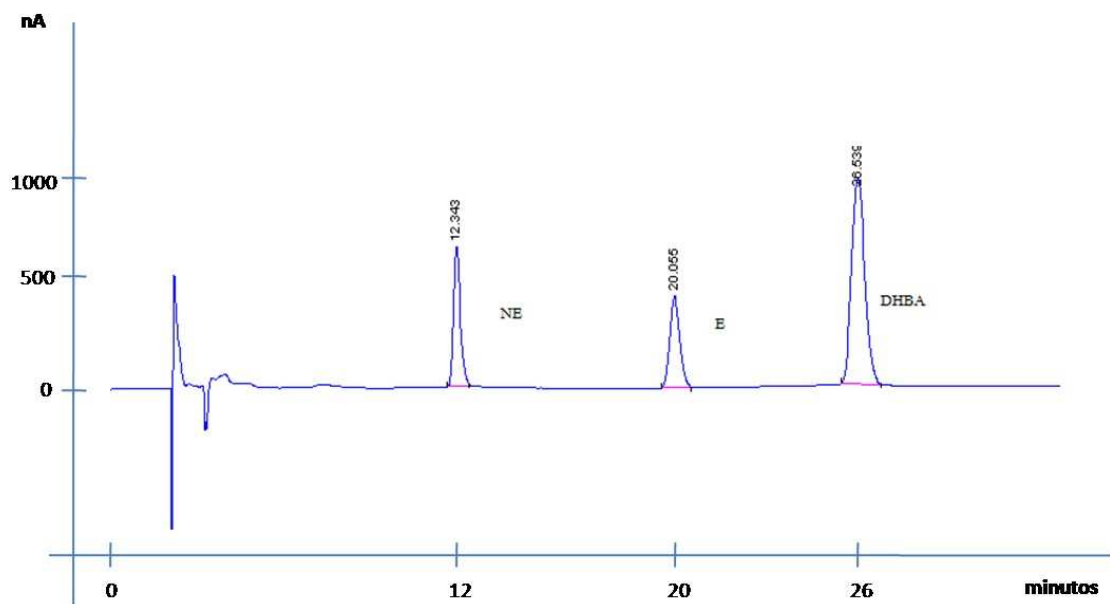


Figura 3: Cromatograma de patrones de epinefrina, norepinefrina y estándar interno

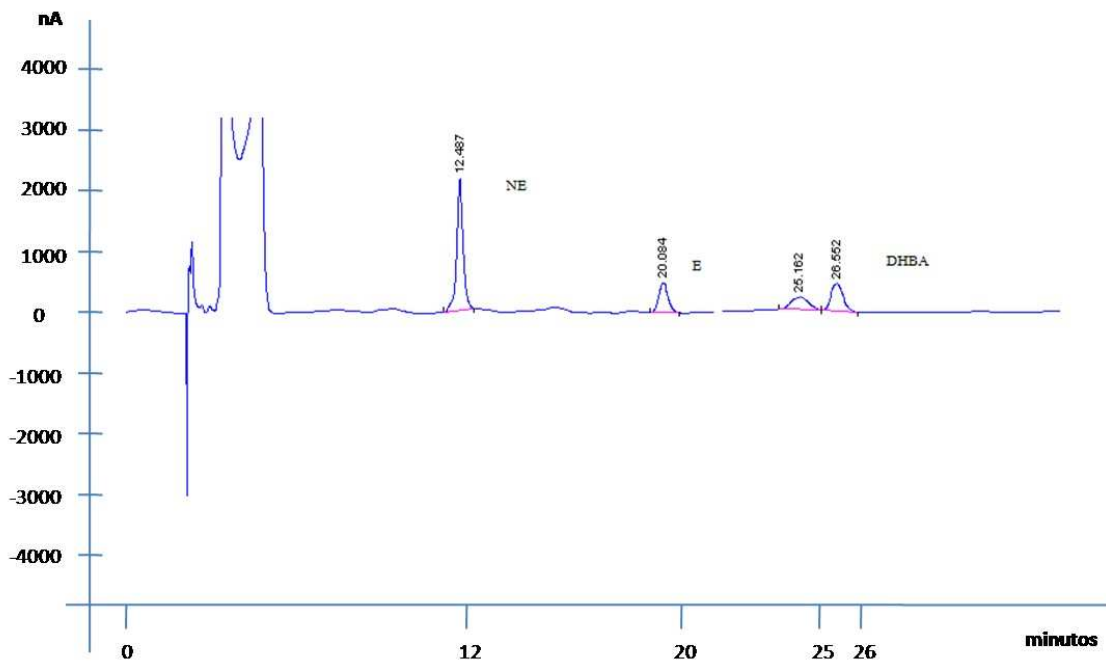


Figura 4:: Cromatograma de una muestra de orina

Conclusiones

Como se ve en los resultados los límites de detección logrados son muy bajos, también se puede destacar que la selectividad es apropiada a pesar de trabajar con muestras donde las matrices son complicadas.

Es importante resaltar que esta técnica fue utilizada para dos ensayos interlaboratorios organizados por el CAP (Colegio Americano de Patólogos) con resultados satisfactorios en ambos.

El sistema de HPLC Agilent Technologies 1200 en conjunto con el detector electroquímico ESA Coulochem III demostró ser una excelente herramienta para estas aplicaciones.