

CATECOLAMINAS NA URINA (HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Catecolaminas em Urina por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
6000	Kit Reagente para Análise de Catecolaminas em Urina (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para análise de Catecolaminas em Urina por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análises de adrenalina, noradrenalina e dopamina em urina empregando um sistema isocrático de HPLC com detector eletroquímico. As catecolaminas são extraídas da amostra através da adsorção em colunas de preparação antes da análise em HPLC. A preparação da amostra é simples e garante a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A determinação dos níveis de catecolaminas na urina tem importância clínica no diagnóstico de feocromocitoma e de outros tumores do sistema nervoso, caracterizados por um grande aumento na produção de catecolaminas no tecido correspondente, resultando num aumento da circulação e excreção de catecolaminas. A determinação quantitativa das catecolaminas na urina também é útil no diagnóstico diferencial de hipertensão e na avaliação da insuficiência cardíaca congestiva, doenças coronarianas, *diabetes mellitus*, arteriosclerose e asma aguda.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica.

PRINCÍPIO

Este kit de reagentes foi desenvolvido para a determinação confiável por HPLC de adrenalina, noradrenalina e dopamina em urina. Antes da separação cromatográfica, os analitos são separados da matriz em urina por troca iônica. O preparo de amostras requer o ajuste do pH da urina diluída, a transferência para uma coluna de preparo e duas etapas de lavagem. Uma coluna dedicada de HPLC em combinação com a fase móvel, otimizada para esta separação em particular, permite uma quantificação cromatográfica segura e confiável.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de metanol, acetato de sódio e ácido cítrico	1 x 1000 mL
Padrão de Calibração de Catecolaminas (aquoso) (Calibration Standard)	Solução aquosa de HCL contendo sais sódicos de noradrenalina, adrenalina, dopamina e DHBA	1 x 10 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de HCL contendo sal sódico de DHBA	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Tampão fosfato sódico e Fenol vermelho	2 x 300 mL
Tampão de Eluição	Solução de ácido	2 x 300 mL

(Elution Buffer)	bórico	
Colunas de preparação (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício (modificado)	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit:

Artigo	Produto	Armazenamento
5001	Fase móvel	18 – 30°C
6003	Padrão de Calibração de Catecolaminas ((aquoso)	2 – 8 °C
6004	Padrão Interno	2 – 8 °C
6055	Tampão de Neutralização	18 – 30°C
6006	Tampão de Eluição	18 – 30°C
6007	Colunas de preparação	18 – 30°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A fase móvel contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo químico livre de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronta para uso.

Padrão de Calibração de Catecolaminas (aquoso): pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Tampão de Neutralização: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 6100).

Padrão de Calibração de Catecolaminas em Urina, liofilizado (Chromsystems art. 6009).

Controle Endócrino em Urina, Nível Normal (Chromsystems art.0040).

Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico (Chromsystems art. 0050)

Água tipo I ou grau HPLC.

Metanol grau HPLC.

HCl.

NaOH.

Centrífuga.

Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Deverão ser analisadas, preferencialmente, amostras de urina de 24 horas coletadas em recipientes contendo 10 mL de HCl 25%. Caso o uso de urina de 24h seja muito difícil ou impossível, amostras de urina espontânea também podem ser utilizadas. Neste caso, os dados devem ser referidos como creatinina urinária.

Estabilidade da amostra: as amostras de 24 h coletadas em recipientes contendo 10 mL de HCl 25%, são estáveis por 5 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar abaixo de - 18°C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): as amostras preparadas são estáveis por até 48 horas entre 2 a 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, as amostras não acidificadas devem ser conservadas em temperaturas abaixo de - 18°C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20µL, tempo de corrida 15 min.

Detector eletroquímico: +400 a +500mV

Fluxo: 0,8 a 1,3 mL/min

Tempo de corrida: 15 min

Procedimento de preparo de amostras:

Etapa de Estabilização e Pré-diluição:

Adicionar 100µL de Padrão Interno e 6,0 mL de Tampão de Neutralização em 3,0 mL de urina. Adicionar NaOH 2N, gota a gota, até a mudança da cor amarela da solução para verde ou cinza-esverdeado. Se a mistura apresentar coloração roxa (alcalina), diminua o pH da solução com adição de HCl 2N gota a gota, até que a solução seja verde ou cinza-esverdeada.

Etapa de Extração e Lavagem:

1. Aplicar todo o conteúdo da amostra pré-diluída e estabilizada na coluna de preparação, descartar o efluente;
2. Completar a coluna com água destilada (aprox. 10 mL), permitir a eluição completa da solução. Repetir este procedimento por mais uma vez. Descartar o efluente.

Etapa de Eluição:

1. Adaptar o tubo plástico para amostra na saída da coluna;
2. Adicionar 6 mL de tampão de eluição e recolher o eluato;
3. Agitar por 30 seg. (vortex);
4. Acidificar o eluato com 180µL de HCl 5M (30 µL de HCl 5M);
5. Injetar 20 µL do eluato no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em min (1mL/min)
Noradrenalina	4,5
Adrenalina	5,5
Padrão Interno (DHBA)	8,3
Dopamina	13,5

CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito, Amostra}} [\text{mg/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}} \times *C_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}}$$

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{amostra}

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = Calibrador

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS_{calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador = *C_{calibrador}

*Concentração de catecolaminas no padrão de calibração aquoso (art. 6003):

Analito	Concentração (µg/L)
Noradrenalina	25
Adrenalina	5
Padrão Interno	1
Dopamina	100

O calibrador aquoso é injetado diretamente no HPLC, sem preparo de amostra.

Concentração do Padrão Interno:

3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA): 1,5 ng/µL

100 µL da solução de padrão interno (1,5 ng/µL) são adicionados a 3 ml de urina. A concentração final do padrão interno na amostra é então 50 ng/mL (50 µL/L). Uma vez que este valor é igual ao do calibrador, a concentração do padrão interno pode ser determinada como "1" em todas as amostras.

*Concentrações utilizando o padrão de calibração em urina (art. 6009):

A concentração dos analitos individuais depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

Cálculo da excreção de 24 horas (µg/24h):

Multiplique a concentração encontrada (µg/L) pelo volume da urina (L).

Cálculo do valor corrigido pela creatinina (em µg/g de creatinina):

Divida a concentração encontrada (µg/L) pela concentração de creatinina na urina (g/L).

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Noradrenalina	5,9102	0,1692
Adrenalina	5,4585	0,1832
Dopamina	6,5274	0,1532

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
6009	Padrão de Calibração de Catecolaminas em Urina (liofilizado)	5 x 10mL
0040	Controle Endócrino em Urina, Nível Normal	10 x 8 mL
0050	Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico	10 x 8 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Faixa de Medição:

Recuperação:

Análito	Recuperação absoluta [%]
Noradrenalina	80
Adrenalina	68
Padrão Interno	91
Dopamina	81

Linearidade / limite de quantificação:

Análito	Limite de quantificação aprox. [µg/L] *	Faixa linear até [µg/L]
Noradrenalina	2.5	1450
Adrenalina	1.6	1800
Dopamina	3.6	2200

*Os limites de quantificação dependem das condições do eletrodo de trabalho.

Precisão intra-ensaio:

Análito	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg/L)		
	n = 10	n = 10	n = 10
Noradrenalina	1.2 (61.1)	1.7 (202)	1.2 (134)
Adrenalina	2.9 (11.7)	1.8 (47.9)	2.1 (30.5)
Dopamina	0.8 (193)	2.2 (453)	1.2 (326)

Precisão inter-ensaio:

Análito	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg/L)	
	n = 80	n = 80
Noradrenalina	2.5 (61.7)	3.1 (204)
Adrenalina	4.1 (11.9)	3.2 (49.8)
Dopamina	3.0 (192)	3.3 (450)

VALORES DE REFERÊNCIA ^[6]

Análito	Conc. (nmol/24h)	Conc. (µg/24h)
Noradrenalina	Até 570	Até 97
Adrenalina	Até 150	Até 27
Dopamina	Até 3240	Até 500

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características de sua população.

LITERATURA

- Cooper JR, Bloom RH, The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 5th Edition, New York, Oxford University Press (1986).
- Wisser H, Knoll E, Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag Stuttgart (Hsrg. H. Greiling und AM Gressner) (1987).
- Bravo EL, Gifford RW, Pheocromocytoma: Diagnosis, Localization and Management, N Engl. J Med. 311:1298-1303 (1984).
- Bravo EL, The Clinical Value of Catecholamine Measurement, Laboratory Management (Jun 1982).
- Proye C, Fossati P, Fontaine P, Lefebvre J, Decoux M, Wemeau JL, Dewailly D, Rwamasirabo E, Cecat P, Dopamine-secreting pheocromocytoma: an unrecognized entity? Classification of pheocromocytomas according to their type of secretion, Surg 6, 1154-1162 (1986).
- Thomas L, Labor und Diagnose. 5th Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2000).
- Ratge D, Baumgardt G, Knoll E, Wisser H, Plasma free and conjugated catecholamines in diagnosis and localization of pheocromocytoma, Clin Chem Acta, 132:229-243 (1983).
- Grobecker H, Saavedra JM, Dominiak P, Catecholamines in experimental and essential hypertension. In: The Heart in

- Hypertension, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 109-121 (1981).
- P Hjerdahl, Plasma catecholamines as makers for sympathoadrenal activity in man, Acta Physiol Scand. 1984, Suppl. 527:7-9.
 - Christensen NJ, Catecholamines and Diabetes Mellitus, Diabetologia, 16:211 (1979).
 - Lake CR, Sternberg DE, Van Kammen DP, Ballenger JC, Ziegler MG, Post RM, Kopin IJ, Bunney WE, Schizophrenia: Elevated Cerebrospinal Fluid Norepinephrine, Science 207:311 (1980).
 - Borg S, Kvande H, Sedvall G, Central Norepinephrine Metabolism During Alcohol Intoxication in Addicts and Healthy Volunteers, Science 213:1135 (1981).
 - Kauert G, Schoppek B, Clarmann VM, Hibler A, Plasma Catecholamin-Verlauf bei Alkylphosphat-Intoxikationen und deren Therapie, Klin Wochenschr. 67:456-462 (1989).
 - Darwish R, Elias AN, Plasma and Urinary Catecholamines and their Metabolites in chronic renal failure, Arch Intern Med. Vol 114, Jan 1984.
 - Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure, N Engl. J Med. 311:819-823 (1984).
 - Goldstein DS, Plasma Catecholamines in Clinical Studies of Cardiovascular Diseases, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:39-41 (1984).
 - Elworthy PM, Hitchcock ER, Estimation of plasma catecholamines by HPLC with ECD in patients with subarachnoid hemorrhage.
 - Wind P, Causon RC, Brown MJ, Barnes PJ, Circulating Catecholamines in Acute Asthma, British Medical Journal, Volume 20 (1985).
 - Halter JB, Stratton JR, Pfeifer MA, Plasma catecholamines in hemodynamic responses to stress states in man, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:31-38 (1984).
 - Hjerdahl P, Freyschuss U, Juhlin-Dahnfeld A, Linde B, Differentiated sympathetic activation during mental stress evoked by the stroop test, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:25-29 (1984).
 - Weicker H, Determination of free and sulfoconjugated catecholamines in plasma and urine by HPLC, Int J Sports Med. 9: 68-74 Suppl. (1988).
 - Pluto R, Bürger P, Normal values of catecholamines in blood plasma determined by HPLC with amperometric detection, Int J Sports Med. 9: 75-78 Suppl. (1988).

Símbolos Usados

-  Fabricante
-  Limites de temperatura
-  Diagnóstico in vitro
-  Cuidado, consulte documentos anexos
-  Consulte instruções de uso
-  Material Reciclável
-  Não rejeitar diretamente para o ambiente
-  Lote
-  Data de Fabricação
-  Validade
-  Risco Biológico
-  Altamente tóxico
-  Corrosivo
-  Nocivo

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ

Cep: 24020-112

CNPJ: 02.220.795/0001-79

MS – nº 10350840114

SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 /

[0800 015 1414](tel:08000151414)

www.biosys.com.br