

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

BIOGENE AMINE
BIOGENIC AMINES
AMINES BIOGÈNES
AMMINE BIOGENE
AMINAS BIÓGENAS



Manual de Instruções para Análise por HPLC de VMA, HVA, 5-HIAA em Urina

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de VMA, HVA, 5-HIAA em urina por HPLC.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 1000/B

VMA, HVA, 5-HIAA NA URINA (HPLC) MS 10350840115

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com as diretrizes DIN EN ISO 9001 e DIN EN ISO 13485. Os produtos são produzidos e colocados em circulação seguindo as diretrizes do IVD 98/79/EC.

© Este documento é protegido pelos direitos autorais. Todos os direitos reservados.

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda.
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
SAC: (21) 3907 2534 / 0800 015 1414 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de

Conteúdo

Sumário

1	Informações gerais	4
2	Introdução	6
2.1	Informações Básicas	6
2.2	Uso pretendido	7
3	Teoria da detecção eletroquímica.....	8
3.1	Princípios gerais	8
3.2	Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica	8
3.3	Otimização do potencial de trabalho	9
4	Sistema de HPLC.....	10
4.1	Parâmetros de equipamentos e instrumentos.....	10
4.2	Coluna cromatográfica.....	11
4.3	Cuidados e manutenção do sistema de HPLC.....	11
4.3.1	Bomba e tubulações	11
4.3.2	Ativação do eletrodo de trabalho	11
4.3.3	Eletrodo de referência	12
4.3.4	Evitando flutuações de fluxo da bomba.....	12
4.3.5	Desligando o equipamento	12
5	Separação cromatográfica	12
6	Preparo da amostra	13
6.1	Coleta e armazenamento de amostras de urina	13
6.2	Reconstituição do calibrador aquoso	14
6.3	Reconstituição do padrão de calibração em urina	14
6.4	Reconstituição dos controles.....	15
6.5	Uso de Padrões Internos	15
6.5.1	Padrão Interno iso-VMA.....	15
6.5.2	Padrão Interno HICA para análise de 5-HIAA por HPLC	15
6.6	Preparo da Amostra.....	16
6.6.1	Tamponamento das amostras de urina	16
6.6.2	Extração de amostras com Colunas de Preparo de Amostras.....	16
6.7	Estabilidade das amostras preparadas	16
7	Resultados e avaliação	17
7.1	Calibração do sistema	17
7.2	Quantificação com Padrão Interno	17
8	Controle de Qualidade	17
9	Valores de referência	17
10	Fatores de conversão	18
11	Armazenamento e validade dos reagentes	19
12	Descarte de resíduos.....	19
13	Exemplos de cromatogramas	20
14	Limitações Clínicas	21
15	Problemas e Soluções.....	22
16	Literatura	24
	Apêndice I: Preparo automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™	25
	Apêndice II: Informações de segurança	28
	Apêndice III: Cálculo manual	29
	Apêndice IV: Validação	30
	Apêndice V: Declaração de Conformidade	32
	Apêndice VI: Símbolos	33

1 Informações gerais

Nº do artigo	Produto																
1000/B	<p>Kit de reagentes para análise por HPLC de VMA, HVA e 5-HIAA em urina. Para 100 análises.</p> <p>Componentes do Kit:</p> <table border="0"> <tr> <td>Fase móvel</td> <td>1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Padrão de Calibração</td> <td>5 x 1.0 ml (liof)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Interno (iso-VMA)</td> <td>100 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem I</td> <td>300 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem II</td> <td>2 x 300 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Eluição</td> <td>200 ml</td> </tr> <tr> <td>Finalizador</td> <td>10 ml</td> </tr> <tr> <td>Colunas de preparação de amostras</td> <td>2 x 50 unid</td> </tr> </table>	Fase móvel	1000 ml	Padrão de Calibração	5 x 1.0 ml (liof)	Padrão Interno (iso-VMA)	100 ml	Tampão de Lavagem I	300 ml	Tampão de Lavagem II	2 x 300 ml	Tampão de Eluição	200 ml	Finalizador	10 ml	Colunas de preparação de amostras	2 x 50 unid
Fase móvel	1000 ml																
Padrão de Calibração	5 x 1.0 ml (liof)																
Padrão Interno (iso-VMA)	100 ml																
Tampão de Lavagem I	300 ml																
Tampão de Lavagem II	2 x 300 ml																
Tampão de Eluição	200 ml																
Finalizador	10 ml																
Colunas de preparação de amostras	2 x 50 unid																
1000/B/A1	<p>Kit de reagentes para análise por HPLC de VMA, HVA e 5-HIAA em urina. Preparação com GILSON® ASPEC™. Para 100 análises.</p> <p>Componentes do Kit:</p> <table border="0"> <tr> <td>Fase móvel</td> <td>1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Padrão de Calibração</td> <td>5 x 1.0 ml (liof)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Interno (iso-VMA)</td> <td>100 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem I</td> <td>300 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem II</td> <td>2 x 300 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Eluição</td> <td>200 ml</td> </tr> <tr> <td>Finalizador</td> <td>10 ml</td> </tr> <tr> <td>Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC</td> <td>100 unid</td> </tr> </table>	Fase móvel	1000 ml	Padrão de Calibração	5 x 1.0 ml (liof)	Padrão Interno (iso-VMA)	100 ml	Tampão de Lavagem I	300 ml	Tampão de Lavagem II	2 x 300 ml	Tampão de Eluição	200 ml	Finalizador	10 ml	Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	100 unid
Fase móvel	1000 ml																
Padrão de Calibração	5 x 1.0 ml (liof)																
Padrão Interno (iso-VMA)	100 ml																
Tampão de Lavagem I	300 ml																
Tampão de Lavagem II	2 x 300 ml																
Tampão de Eluição	200 ml																
Finalizador	10 ml																
Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	100 unid																
1000/B/A5	<p>Kit de reagentes para análise por HPLC de VMA, HVA e 5-HIAA em urina. Preparação com GILSON® ASPEC™. Para 500 análises.</p> <p>Componentes do Kit:</p> <table border="0"> <tr> <td>Fase móvel</td> <td>3 x 1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Padrão de Calibração</td> <td>3 x 5.0 ml (liof)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Interno (iso-VMA)</td> <td>2 x 250 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem I</td> <td>1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Lavagem II</td> <td>2 x 1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Eluição</td> <td>1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Finalizador</td> <td>50 ml</td> </tr> <tr> <td>Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC</td> <td>5 x 100 unid</td> </tr> </table>	Fase móvel	3 x 1000 ml	Padrão de Calibração	3 x 5.0 ml (liof)	Padrão Interno (iso-VMA)	2 x 250 ml	Tampão de Lavagem I	1000 ml	Tampão de Lavagem II	2 x 1000 ml	Tampão de Eluição	1000 ml	Finalizador	50 ml	Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	5 x 100 unid
Fase móvel	3 x 1000 ml																
Padrão de Calibração	3 x 5.0 ml (liof)																
Padrão Interno (iso-VMA)	2 x 250 ml																
Tampão de Lavagem I	1000 ml																
Tampão de Lavagem II	2 x 1000 ml																
Tampão de Eluição	1000 ml																
Finalizador	50 ml																
Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	5 x 100 unid																
1000/B/A9	<p>Kit de reagentes para análise por HPLC de VMA, HVA e 5-HIAA em urina. Preparação com GILSON® ASPEC™. Para 1000 análises.</p> <p>Componentes do Kit:</p> <table border="0"> <tr> <td>Fase móvel</td> <td>6 x 1000 ml</td> </tr> </table>	Fase móvel	6 x 1000 ml														
Fase móvel	6 x 1000 ml																

	Padrão de Calibração	5 x 5.0 ml (liof)
	Padrão Interno (iso-VMA)	1000 ml
	Tampão de Lavagem I	2 x 1000 ml
	Tampão de Lavagem II	4 x 1000 ml
	Tampão de Eluição	2 x 1000 ml
	Finalizador	2 x 50 ml
	Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	10 x 100 unid
Componentes disponíveis separadamente:		
1011	Fase Móvel	1000 ml
1012	Fase Móvel	10 x 1000 ml
1003/B	Padrão de Calibração	5 x 1.0 ml (liof)
1009	Padrão de Calibração em Urina	5 x 5.0 ml (liof)
1004/B	Padrão Interno	100 ml
1005	Tampão de Lavagem I	300 ml
1006	Tampão de Lavagem II	300 ml
1077	Tampão de Eluição	200 ml
1013	Finalizador	10 ml
1008	Colunas de preparação de amostras	50 unid
Controles (liofilizados)		
0040	Controle endócrino em urina, nível normal	10 x 8 ml
0050	Controle endócrino em urina, nível patológico	10 x 8 ml
Acessórios		
1100/B	Coluna para HPLC. (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK, 5 µm	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça
17001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
17002	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
Acessórios Adicionais		
51303/B	Padrão Interno (10 mg HICA/I) (para melhor aproveitamento da análise de 5-HIAA)	5 ml
1099	Mix de Optimizador Potencial	5 x 0.5 (liof)
Acessórios Acionais para preparação com GILSON® ASPEC™		
1009/T	Padrão de Calibração em Urina	5.0 ml (liof)
1044/B/A1	Padrão Interno	100 ml
1044/B/A5	Padrão Interno	250 ml
1044/B/A9	Padrão Interno	1000 ml
1005/A5	Tampão de Lavagem I	1000 ml
1006/A	Tampão de Lavagem II	450 ml
1006/A5	Tampão de Lavagem III	1000 ml
1008/A	Colunas de preparação de amostras com cápsulas DEC	100 unid
1013/A5	Tampão de Eluição	50 ml
1077/A5	Finalizador	1000 ml

2 Introdução

2.1 Informações Básicas

O **ácido vanilmandélico (VMA)** e o **ácido homovanílico (HVA)** são produtos de degradação das catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina), e a dopamina, **ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA)** do neurotransmissor serotonina.

As catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina), e dopamina, assim como o neurotransmissor serotonina, estão entre as aminas biogênicas que são produzidas por descarboxilação enzimática de aminoácidos no organismo. Como mensageiros, eles executam um papel chave na transmissão de impulsos no sistema nervoso. Através da interação com receptores de membrana, cada molécula individual exerce efeitos complexos, especialmente no sistema cardiovascular. A serotonina também regula a função do sistema gastrointestinal e influencia no humor afetando o sistema nervoso central.

Metabolismo

O aminoácido L-tirosina é convertido em dopamina, que por sua vez é hidroxilado a L-noradrenalina pela enzima dopamina β-hidroxilase (DBH). A feniletanolamina n-metiltransferase (PNMT) catalisa a metilação pela catecolamina-O-metiltransferase (COMT) e a desaminação pela monoamina oxidase (MAO). A figura 1 mostra os produtos de degradação do ácido homovanílico (HVA) e do ácido vanilmandélico (VMA) relevantes para o diagnóstico.

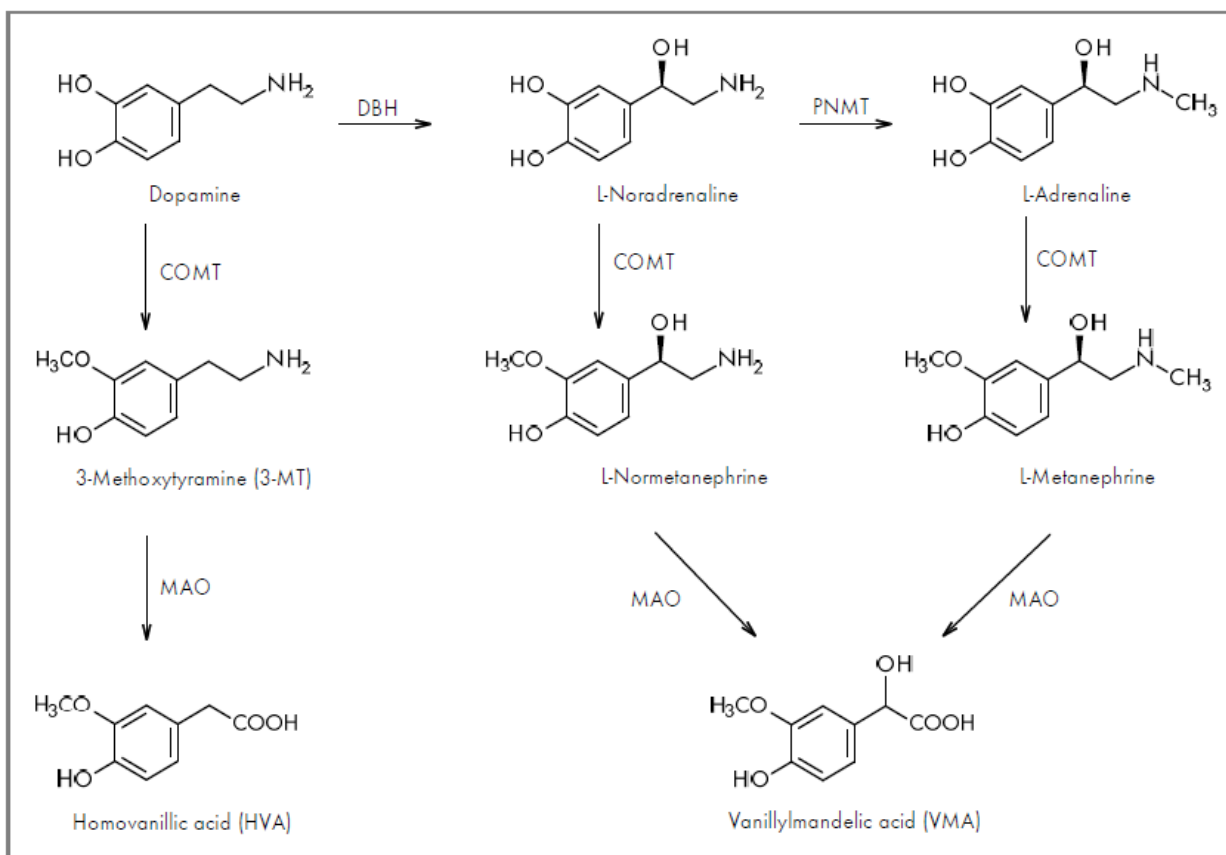


Figura 1 – Metabolismo das Catecolaminas

A serotonina é enzimaticamente desaminada com a monoamina oxidase (MAO) e então oxidada pela aldeído desidrogenase (ALDH) ao principal produto de excreção, o ácido 5-hidroxi-indolacético.

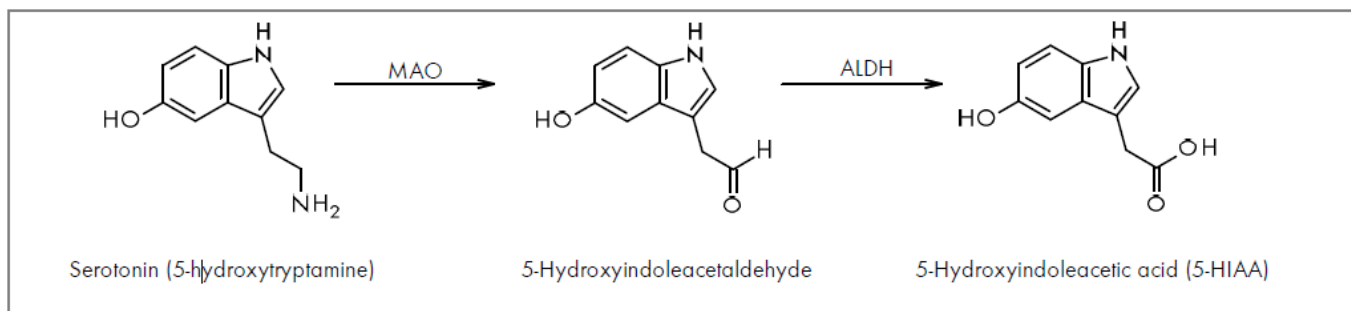


Figura 1 – Metabolismo da Serotonina

Importância no diagnóstico

As análises dos metabólitos descritos VMA, HVA e 5-HIAA é de particular interesse para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos. Como suas células originárias, esses tumores produzem catecolaminas ou serotoninas e, conseqüentemente, seus produtos de degradação são rapidamente eliminados. Sintomas como dor de cabeça paroxística, transpiração, hipertensão arterial e palpitações, ou dor fácil paroxística são diretamente atribuíveis ao aumento da produção e liberação de neurotransmissores.

Neuroblastomas

Neuroblastomas surgem de células do tubo neural embrionário e são, por isso, quase exclusivamente encontrados em crianças. Eles podem ocorrer dentro e fora do rim e produzem catecolaminas [1]. Para diagnóstico, principalmente VMA, HVA e dopamina, raramente noradrenalina, adrenalina, normetanefrina e metanefrina, são determinados em urina [5].

Feocromocitoma e paraganglioma

Ambos os tumores produzem catecolaminas. Feocromocitomas surgem no tecido de cromafina da medula adrenal, enquanto paragangliomas tendem a se formar fora do rim no plexo nervoso simpático da região abdominal e pélvica [1]. Para essas síndromes, a determinação de catecolaminas e metanefrinas em urina é importante [4]. A determinação do metabólito VMA mostra alta especificidade (os resultados dos testes de pessoas saudáveis serão muito provavelmente negativos), porém a sensibilidade é baixa, significando que os resultados de indivíduos não saudáveis serão frequentemente positivos. Esta é a razão pela qual a determinação de VMA para a identificação desses tumores é raramente utilizada [4].

Tumores produtores de serotonina (também: carcinoides)

Além disso, há um grupo de tumores neuroendócrinos do trato gastrointestinal que produzem serotonina e, por isso, causam sintomas específicos (chamado síndrome carcinóide) [2]. Usualmente, 5-HIAA é determinado em urina; serotonina em urina é elevada somente em um subconjunto especial de carcinoides [6].

2.2 Uso pretendido

O kit de reagentes da Chromsystems VMA, HVA, 5-HIAA em urina é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser utilizada em laboratórios clínicos para detecção quantitativa do ácido vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) em amostras de urina humana através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit é usado como um teste para pacientes cujo nível desses metabólitos na urina sejam de importância clínica.

Princípio do kit de reagentes:

Este Kit de reagentes é desenvolvido para a determinação confiável dos ácidos vanilmandélico, homovanílico e 5-hidroxiindolacético em urina. Antes da separação cromatográfica, os analitos são separados da matriz urinária por troca iônica – Colunas de preparo de amostras (Sample Clean Up columns) garantem um fácil preparo de amostras.

Uma coluna selecionada de HPLC em combinação com a fase móvel, otimizadas para essa separação em particular, permitem uma quantificação cromatográfica correta e confiável. Com o kit Chromsystems de HPLC, uma pessoa pode analisar até 100 amostras de plasma por dia. O método analítico fornece resultados rápidos e confiáveis sendo assim, adequado para análises de rotina. Com o kit de reagentes da Chromsystems, até mesmo laboratórios com pouca experiência em HPLC são capazes de estabelecer esta tecnologia sem grandes esforços.

3 Teoria da detecção eletroquímica

3.1 Princípios gerais

A técnica de medição eletroquímica mais empregada na cromatografia líquida é a amperométrica, com potencial de trabalho constante. Os detectores amperométricos convencionais utilizam uma célula com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar.

O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado entre o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. O eletrodo auxiliar é necessário para a manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente na célula de referência. Uma substância eletroquimicamente ativa que passe através da célula de detecção será oxidada (emissão de elétrons) ou reduzida (absorção de elétrons). A corrente resultante entre os eletrodos de trabalho e auxiliar é detectada pelo instrumento de medição, amplificada e mostrada como o sinal cromatográfico.

Uma vez que somente um número limitado de grupos funcionais e estruturas químicas são susceptíveis a processos de oxi-redução, em um específico potencial de trabalho, a detecção eletroquímica não é apenas caracterizada por sua alta sensibilidade, mas também por sua elevada seletividade.

3.2 Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica

A seleção do potencial de trabalho apropriado é extremamente importante para a seletividade da análise. Deve-se escolher um potencial de trabalho que produza um sinal máximo de detecção para a substância de interesse e, ao mesmo tempo, nenhum sinal para possíveis substâncias interferentes, normalmente presentes na amostra analisada.

A relação entre o sinal de detecção e o potencial no eletrodo de trabalho pode é mostrada na figura abaixo.

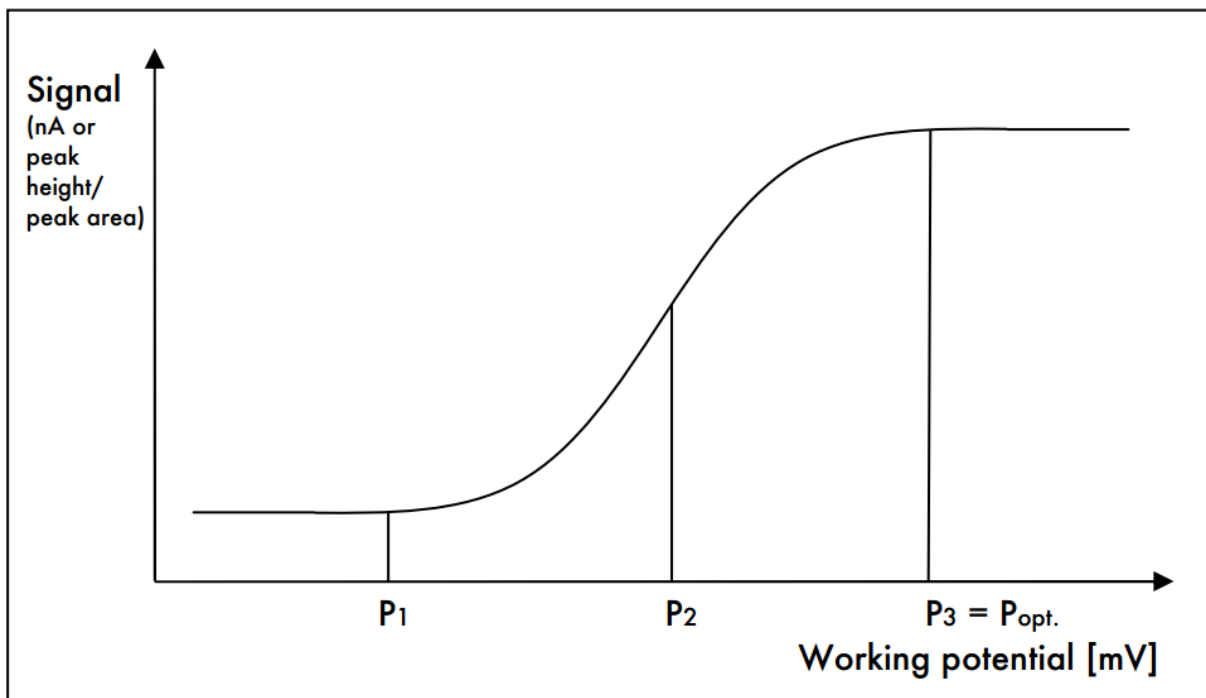


Figura 3: Correlação entre potencial de trabalho e detector de sinal.

A um potencial inferior a P1, não há energia suficiente disponível para a transformação eletroquímica das moléculas na superfície do eletrodo de trabalho. Aumentar o potencial para P2 aumenta a energia disponível, de modo que uma proporção substancial das moléculas que chegam ao eletrodo de trabalho já será transformada.

Aumentar ainda mais o potencial, para P3, fornece energia suficiente para transformar todas as moléculas que chegam ao eletrodo de trabalho.

Nenhum aumento adicional no sinal é alcançado aumentando ainda mais o potencial. O sinal agora depende apenas da concentração das substâncias no eletrodo (platô dependente da difusão). Como nenhum aumento adicional no sinal é possível após atingir o platô, não é aconselhável medir potenciais maiores que P3. Pelo contrário, em potenciais mais elevados a seletividade será perdida, pois quanto maior for a energia disponível, maior será o número de substâncias que serão transformadas eletroquimicamente.

3.3 Otimização do potencial de trabalho

Experiências têm demonstrado que a curva de potencial de trabalho versus sinal cromatográfico (ver sessão 3.1) para uma dada substância difere de detector para detector. Isto se deve ao fato de que os sistemas de referência (eletrodos de referência) nos diferentes detectores eletroquímicos não são completamente idênticos e produzem diferentes potenciais de referência.

Isto significa que o potencial de trabalho otimizado para um sistema de HPLC, com detecção eletroquímica, deve ser determinado empiricamente, através de injeções um padrão em diferentes potenciais de trabalho.

Para a otimização da análise de VMA, HVA e 5-HIAA, avalia-se a área ou a altura do pico do VMA e do padrão interno do ácido isovanilmandélico (Isso-VMA) em Padrão de Calibração (artigo 1003/B), ou o Mix de Otimização de Potencial (artigo 1099), uma vez que sua transformação eletroquímica requer o maior potencial de trabalho.

Para tanto, o seguinte procedimento é recomendado:

1. Ajuste o potencial de trabalho em +680mV e injete o padrão de calibração aquoso (artigo 1003/B) ou o Mix de otimização de potencial (artigo 1099). Determine a área ou a altura do pico de VMA e iso-VMA no cromatograma obtido.
2. Aumente o potencial de trabalho em 40mV. Injete novamente o padrão de calibração (artigo 1003/B) ou o Mix de otimização do potencial (artigo 1099). Determine a área ou a altura do pico de VMA e iso-VMA no cromatograma obtido.
3. Se a área/altura de iso-VMA for <70% do pico de VMA repita a etapa 2 do procedimento.
4. Se a área/altura de iso-VMA for =70% do pico de VMA, o potencial de trabalho está otimizado.

Otimização rápida – Mix de otimização de potencial (artigo 1099)

O tempo de otimização pode ser reduzido até 50% pelo uso do Mix de otimização de potencial (artigo 1099). Este padrão inclui somente os analitos VMA e iso-VMA.

O potencial de trabalho obtido por este método geralmente encontra-se entre +700mV e +850mV (Com eletrodos de referência de Ag/AgCl) e não é influenciado por manutenções de rotina na célula de medição do detector, tais como reposição da solução de KCl ou ativação do eletrodo de trabalho.

Entretanto, após reparos ou manutenções mais abrangentes no detector eletroquímico, tais como substituição do eletrodo de referência, o procedimento de otimização do potencial de trabalho deve ser repetido. Antes de cada série de análises, o calibrador deve ser injetado e o cromatograma comparado com o cromatograma de referência. Em caso de desvio significativo, o potencial deve ser otimizado novamente.

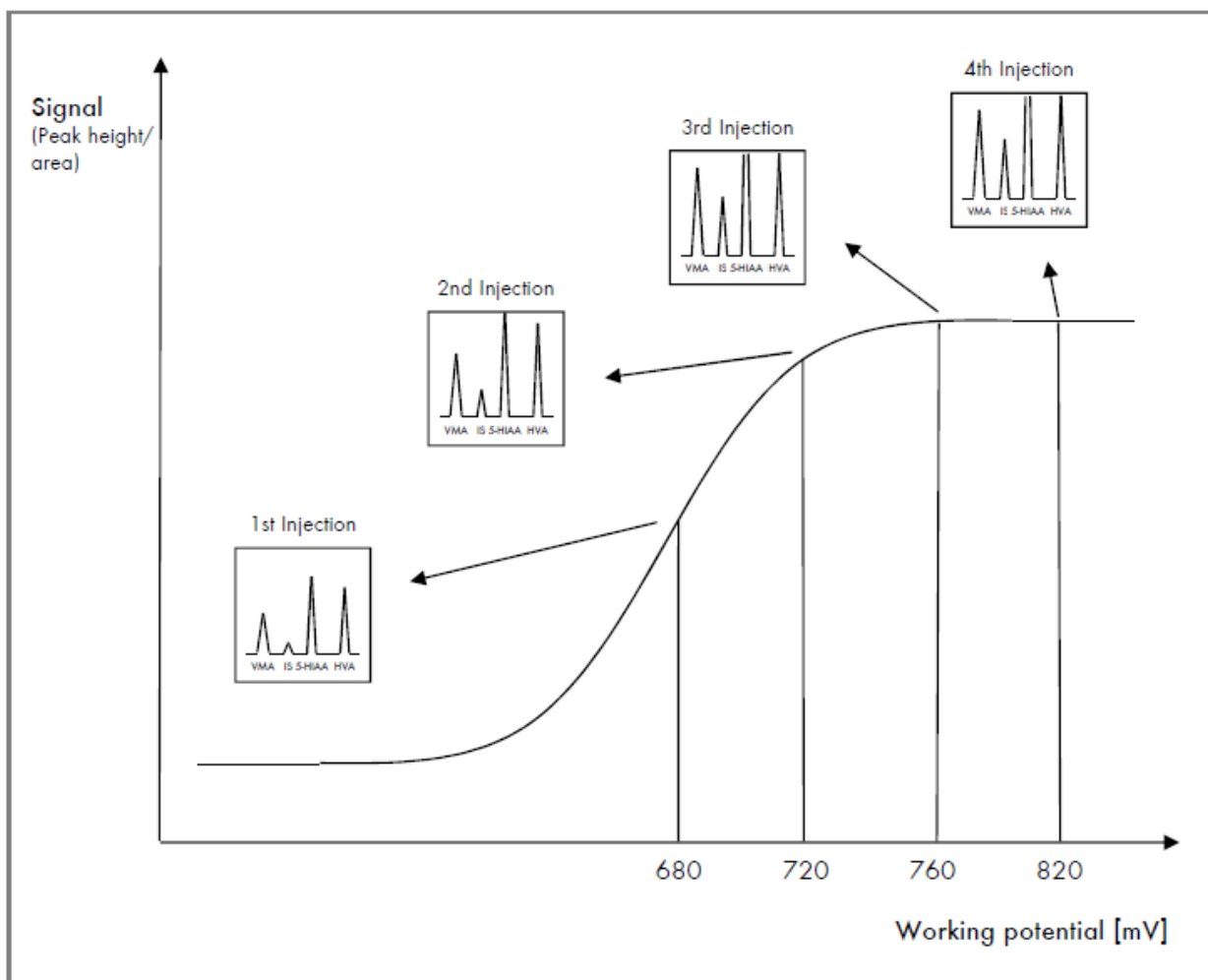


Figura 4: Otimização do potencial de trabalho

4 Sistema de HPLC

Atenção: Ao usar os reagentes, cumprir com as informações de riscos no Apêndice II.

4.1 Parâmetros de equipamentos e instrumentos

A determinação de VMA, HVA, 5-HIAA na urina requer um sistema isocrático com bomba de HPLC, injetor e detector eletroquímico. A utilização de forno de coluna evitará variações de temperatura e melhorará a estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica. Mantenha a fase móvel tampada ou coberta mesmo durante a operação.

Configurações do instrumento:

Volume de injeção: 10–20 μ l

Tempo de execução: aprox. 20 minutos

Taxa de fluxo: 1 ml/min*

Temperatura da coluna: +20 a +25 °C

Pressão da coluna: aprox. 150–160 barras

Detector eletroquímico: potencial de trabalho: aprox. +700 a +850mV
corrente de fundo: <5 nA

Solução de enxágue de agulha para o injetor: água/metanol, 95/5

4.2 Coluna cromatográfica

A coluna de HPLC para a determinação de VMA, HVA, 5-HIAA é fornecida equilibrada e testada, e pronta para uso. Ela pode ser usada diretamente. O valor da pressão de uma coluna nova, em um fluxo de 1.0 mL/min, é de aproximadamente 150-160 bar. Este valor pode aumentar com a idade da coluna. Desde que as separações sejam satisfatórias, uma contrapressão elevada não terá consequências, mas não deverá exceder 200 bar..

Nota: Para prolongar a vida útil da coluna, pode ser utilizada uma pré-coluna (artigo 17002 e 17001) ou um pré-filtro (artigo 15009 e 15010).

Antes de iniciar uma sequência de testes, prepare o sistema HPLC da seguinte forma:

1. Conecte a coluna analítica à bomba HPLC na direção do fluxo
2. Enxágue com 20 ml de fase móvel a uma vazão de 1 ml/min
3. Conecte o capilar da saída da coluna à entrada da célula detectora
4. Conecte um capilar de drenagem à saída da célula detectora
5. Equilibre o sistema a uma taxa de fluxo de 1 ml/min até que a linha de base se estabilize
6. Injete o calibrador repetidamente, até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção e áreas/alturas de pico idênticos

Assim que o sistema estiver equilibrado e a corrente de fundo for inferior a 5 nA, a fase móvel pode ser recirculada.

4.3 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC

4.3.1 Bomba e tubulações

O trabalho analítico, na faixa de sensibilidade necessária para esta análise, requer limpeza minuciosa de todos os componentes. Por isso use somente reagentes e solventes com grau de pureza apropriado. Especialmente na detecção eletroquímica, mesmo os menores traços de substâncias eletroquimicamente ativas levam a aumentos substanciais na linha de base ou pico adicionais. **Na maioria dos casos, os problemas de detecção eletroquímica resultam de contaminações do sistema de HPLC. Como regra geral, uma passivação do sistema de HPLC com ácido nítrico é recomendada a cada 3-4 meses (dependendo do volume de amostras).**

Procedimento de peroxidação passiva:

Antes da passivação, a coluna de HPLC e o detector eletroquímico devem ser desconectados. Você deve passivar também o capilar levado da coluna analítica para a célula detectora; simplesmente integre-o no sistema capilar com uma união.

Antes de lavar com ácido nítrico, o tampão de equilíbrio deve ser lavado com água (aproximadamente 20 ml). Então 15-20% de ácido nítrico é bombeado através do capilar e do sistema de injeção a um fluxo de 1-2 ml/min por 20 min. A unidade de injeção deve executar o procedimento de injeção várias vezes. Com sistemas de injeção manual alterne de **LOAD** para **INJECT** pelo menos 10 vezes. Ao usar um amostrador automático carregue 15-20% de ácido nítrico nos frascos de amostras e injete o maior volume possível.

Após a passivação lave o ácido nítrico do sistema com água ultrapura (grau HPLC), novamente ativando o procedimento de injeção várias vezes. O pH da água de lavagem efluente deve atingir o pH da água de influxo antes de reequilibrar o sistema com fase móvel novamente.

4.3.2 Ativação do eletrodo de trabalho

O uso prolongado do detector eletroquímico pode resultar em contaminação da superfície ativa do eletrodo de trabalho, levando a uma diminuição na sensibilidade. Para restabelecer a sensibilidade do eletrodo, trate o eletrodo de trabalho de carbono vítreo com uma solução de ativação adequada.

Se você tiver quaisquer perguntas em relação a ativação do eletrodo de trabalho, contate o seu representante Chromsystems, ligue para nosso número em Monique (telefone: +49 89 189930-300) ou envie um e-mail para nosso grupo de suporte: HPLC-support@chromsystems.com / hplc.lcsmms@biosys.com.br

4.3.3 Eletrodo de referência

(Somente aplicável para os detectores eletroquímicos da Chromsystems, Pharmacia ou Waters)

Com o tempo, os íons da solução de cloreto de potássio (3 mol/l KCl) migram através da membrana (diafragma) do eletrodo para a fase móvel, alterando o potencial do eletrodo de referência para valores mais altos. Para garantir um potencial definido no sistema de referência, é essencial completar a solução de cloreto de potássio 3 M do eletrodo de referência pelo menos uma vez por semana. Nesse procedimento, certifique-se de não deixar bolhas de ar no interior do eletrodo.

Um adaptador de Teflon branco fixa o eletrodo de referência na célula analítica. Um diafragma de vidro poroso, embaixo do adaptador, controla a difusão dos íons entre a fase móvel e o eletrodo de referência. A cristalização de sais dentro da célula pode causar rachaduras no diafragma, resultando em um vazamento entre o fluxo do eluente e a parte interna do eletrodo de referência.

Se um eletrodo de Ag/AgCl tem sido usado por um período maior, o AgCl pode precipitar como uma camada escura na membrana. Um precipitado de AgCl como esse na membrana perturba o equilíbrio do sistema de referência. O potencial de trabalho configurado não pode ser mantido constante. Para superar isso ou substitua o adaptador do eletrodo ou tente limpar a membrana com 25% de amônia (coloque o adaptador de Teflon em 25% de amônia durante a noite, e então lave abundantemente com água).

4.3.4 Evitando flutuações de fluxo da bomba

A detecção eletroquímica é baseada em reações eletroquímicas das substâncias analisadas (analitos) na superfície do eletrodo de trabalho. A taxa de reação depende diretamente da velocidade com que os analitos são transportados para o eletrodo. Flutuações de fluxo da bomba podem causar uma taxa de reação irregular dos analitos na superfície do eletrodo, deixando a linha de base instável. Em análises de elevada sensibilidade, é recomendável que a bomba tenha um sistema abafador de pulsos.

4.3.5 Desligando o equipamento

Caso o equipamento não seja usado por um período de até uma semana, recomenda-se deixar a fase móvel circulando através do sistema em fluxo baixo (0.2 ml/min).

Para períodos maiores sem utilizar o equipamento, seguir os procedimentos abaixo:

1. Desconectar e guardar a coluna de HPLC. Não é necessário realizar um procedimento de lavagem da coluna. Esta deverá ser armazenada na própria fase móvel em temperatura ambiente.
2. O detector deverá ser colocado no modo de *stand-by*.
3. O sistema de HPLC deverá ser lavado com no mínimo 50ml de água/metanol (1:1).
4. Os eletrodos de referência e de trabalho deverão ser removidos e lavados com água e armazenados secos para uso futuro. **Marcar o lado ativo do eletrodo de trabalho.**

5 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção aproximados dos analitos a uma vazão de 1,0 ml/min.

<i>Substância</i>	<i>Tempo de Retenção</i>
VMA	3.0 min
Padrão Interno (isso-VMA)	4.0 min
5-HIAA	9.4 min
HVA	13.4 min
Padrão Interno (HICA)	14.8 min

Tabela 1: Tempos de retenção

A duração da separação cromatográfica (incluindo HICA) é de cerca de 20 minutos para uma vazão de 1,0 ml/min. Os tempos de retenção podem variar ligeiramente, por exemplo, se houver uma alteração na temperatura ambiente, se utilizar um novo lote de fase móvel ou se substituir a coluna de HPLC. Portanto, use um cromatograma de calibração para determinar os valores atuais.

6 Preparo da amostra

Atenção: Antes de utilizar os reagentes do Kit, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice II.

As amostras também podem ser preparadas automaticamente com Gilson® ASPEC™. Favor verificar Apêndice I.

6.1 Coleta e armazenamento de amostras de urina

O material investigado deve ser urina.

Normalmente a urina de 24h é utilizada para análise. Se for difícil ou impossível, urina espontânea pode ser testada. Nestes casos os resultados devem ser baseados na creatinina.

Determinação de VMA/HVA [4]:

Para a determinação de VMA e HVA, a urina de 24 horas deve ser coletada em um frasco adequado contendo 10 ml de 10-25 por cento de solução de ácido clorídrico. Protegida da luz, a urina coletada dessa maneira é estável a temperatura ambiente por 7 dias, em +2 a +8°C por 14 dias, e abaixo de -18°C por pelo menos 3 meses.

Determinação de 5-HIAA [6]:

Para a determinação de 5-HIAA, a urina de 24 horas deve ser coletada em um frasco adequado e armazenado a +2 a +8°C protegido da luz. A acidificação da urina só é necessária para remessa postal ou para coleta em temperatura ambiente. Neste caso, o frasco de coleta deve conter 10 a 20 ml de ácido acético glacial.

A urina coletada dessa maneira deve ter um valor de pH de 4.0. Protegida da luz, ela é estável em +2 a +8°C por até 2 semanas.

Nota: A urina de coleta com ácido clorídrico deve ser ajustada com hidróxido de sódio para um pH de 4 a 6 e analisada assim que possível. As altas concentrações de cloreto na urina fortemente ácida (pH < 1,0) podem levar a recuperações reduzidas na preparação da amostra.

Os seguintes alimentos possuem altas concentrações de serotonina. O consumo resulta em um aumento da excreção urinária de 5-HIAA. Os pacientes devem evitar esses alimentos nos 3 a 4 dias anteriores e durante a coleta de urina:

Berinjelas	Melões
Abacates	Mirabelle
Bananas	Abacaxis
Groselha-preta	Groselha-vermelha
Ameixa Damson	Tomates
Groselhas	Noz

As seguintes drogas e medicamentos podem influenciar os níveis de HVA na urina:

- Aumentos do resultado analítico por: acetanilida, cafeína, cumarina, efedrina-HCl, mefenesina, metanfetamina, metocarbamol, nicotina, paracetamol, fenacetina, fenobarbital, fentolamina.
- Diminuição do resultado analítico por: aspirina, clorpromazina, isoniazida, levodopa, metanamina, prometazina, estreptozocina

Nota:

É de responsabilidade individual do laboratório usar todos as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinas critérios específicos de estabilidade para o laboratório.

6.2 Reconstituição do calibrador aquoso

Antes do preparo de amostras, reconstitua o calibrador aquoso (artigo 1003/B) como descrito:

1. Pipete 1000 µl 0.2 M HCl no frasco original
2. Misture bem a solução por 10 minutos

Os níveis de calibradores são rastreáveis às concentrações iniciais das substâncias puras (ver cap. 6.1)

O calibrador reconstituído com HCl deve ser preparado fresco a cada dia porque o 5-HIAA é instável em baixo pH. O armazenamento do calibrador reconstituído só é possível se o a solução liofilizada for **reconstituída com água ao invés de HCl** e armazenada abaixo de -18°C. As alíquotas descongeladas devem ser ajustadas a uma concentração de 0.2 M de HCl antes da cromatografia.

Exemplo de reconstituição para armazenamento abaixo de -18°C:

1. Reconstituir o padrão com 800 µl H₂O.
2. Dividir em 5 alíquotas de 160 µl cada,
3. Congelar abaixo de -18°C,
4. Após descongelamento, adicionar 40 µL HCl 1M a cada alíquota.

Como alternativa, o padrão de calibração pode ser reconstituído com tampão de eluição (950 µl + 50 µl do finalizador), então o calibrador pode ser armazenado por até 5 dias em temperaturas entre +2° e +8°C.

6.3 Reconstituição do padrão de calibração em urina

Antes do preparo de amostras, reconstitua o calibrador em urina (artigo 1009) como descrito:

1. Pipete 5.0 ml de água destilada no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 minutos a +20 a +25°C, inverta repetidamente e suavemente

Verifique se o conteúdo dos frascos está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda forem visíveis, prolongue o tempo de reconstituição. Evite exposição direta à luz solar.

Os níveis de calibradores são rastreáveis às concentrações iniciais das substâncias puras. As concentrações dos analitos no calibrador são dependentes do lote. Os níveis individuais são fornecidos na bula do calibrador.

Atenção:

Este produto foi fabricado a partir de pool de urina humana. Um risco potencial de infecção não pode ser inteiramente excluído. Considere todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e tenha o mesmo cuidado ao manusear esse produto como se estivesse manuseando amostras de pacientes potencialmente infectantes.

Estabilidade dos calibradores após reconstituição:

O calibrador dissolvido em água possui as seguintes estabilidades:

Tabela 2: Estabilidade do calibrador após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
------------------------------	--------------	-----------------------------------

+2 a +8°C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18°C	3 meses*	Protegido da luz, bem fechado

*Para 5-HIAA, a estabilidade é de 1 mês abaixo de -18°C.

6.4 Reconstituição dos controles

Antes do preparo de amostras, reconstitua os controles de urina (artigos 0040, 0050) como seguinte:

1. Pipete 8.0 ml de água destilada no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 min em +20 a +25°C, inverta repetidamente e suavemente

Verifique se o conteúdo dos frascos está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda forem visíveis, prolongue o tempo de reconstituição. Evite exposição direta à luz solar.

As concentrações dos analitos nos controles são dependentes do lote. Os níveis individuais são fornecidos nas bulas que acompanham cada controle.

Atenção:

Este produto foi fabricado a partir de pool de urina humana. Um risco potencial de infecção não pode ser inteiramente excluído. Considere todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e tenha o mesmo cuidado ao manusear esse produto como se estivesse manuseando amostras de pacientes potencialmente infectantes.

Estabilidade dos controles após reconstituição:

Os controles dissolvidos em água possuem as seguintes estabilidades:

Tabela 3: Estabilidade dos controles após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 a +8°C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18°C	3 meses*	Protegido da luz, bem fechado

*Para 5-HIAA, a estabilidade é de 1 mês abaixo de -18°C.

6.5 Uso de Padrões Internos

6.5.1 Padrão Interno iso-VMA

O padrão interno (iso-VMA, artigo 1004/B) é tamponado. A adição em espécimes de urina leva diretamente ao ajuste de pH requisitado.

A concentração da solução de Padrão Interno é de 0.5 mg/l (=0.5 µg/ml) de iso-VMA.

6.5.2 Padrão Interno HICA para análise de 5-HIAA por HPLC

A adição do padrão interno (HICA, artigo 51303/B) durante o preparo do calibrador e de amostras de urina aumenta a acurácia da quantificação de 5-HIAA.

Preparo de Padrão de Calibração HICA:

1. Pipete 975 µl de 0.2M HCl no frasco original do calibrador aquoso (artigo 1003/B)
2. Adicione 25 µl de padrão interno (HICA, artigo 51303/B)

- Misture bem a solução por 10 min

O calibrador reconstituído agora está pronto para a injeção no HPLC.

6.6 Preparo da Amostra

6.6.1 Tamponamento das amostras de urina

Somente iso-VMA como Padrão Interno:

- Transfira 50 µl de amostra de urina em um frasco adequado (ex. vial de 1.5 ml)
- Adicione 1.0 ml de Padrão Interno (iso-VMA, artigo 1004/B)
- Misture brevemente

Iso-VMA e HICA como Padrão Interno:

- Transfira 50 µl de amostra de urina em um frasco adequado (ex. vial de 1.5 ml)
- Adicione 1.0 ml de Padrão Interno (iso-VMA, artigo 1004/B)
- Adicione 50 µl de Padrão Interno (HICA, artigo 51303/B)
- Misture brevemente

Não é necessário ajuste de pH.

6.6.2 Extração de amostras com Colunas de Preparo de Amostras

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análises, trabalhe com as seguintes etapas na ordem apresentada:

- Aplique o volume inteiro de urina tamponada (ver capítulo 5.6.1) em uma coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugação (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
- Aplique 3.0 ml do Tampão de Lavagem I à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
- Aplique 3.0 ml do Tampão de Lavagem II à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
- Repita a etapa 3
- Aplique 2 ml do Tampão de Eluição à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (1 min a 700 x g), colete o eluato
- Adicione 100 µl do Finalizador ao eluato, misture brevemente
- Injete 10-20 µl no sistema de HPLC

Atenção:

As altas concentrações de cloro em urinas coletadas fortemente acidificadas (pH < 1.0) resultam em uma redução na capacidade de ligação (overload) da coluna de preparo de amostras. Neste caso dilua a espécime de urina em 1:1 com água ultrapura (grau HPLC).

6.7 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas para análise como indicado na seção 5.6 possuem a seguinte estabilidade:

Tabela 4: Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 a +8°C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro

É fortemente recomendável não armazenar amostras preparadas por períodos prolongados mesmo congeladas (abaixo de -18°C).

7 Resultados e avaliação

7.1 Calibração do sistema

Para calibrar seu sistema de análise e verificar o desempenho de separação do sistema HPLC, realize vários testes antes de analisar amostras de pacientes. Utilize para isso o calibrador de urina preparado (artigo 1009) ou o calibrador aquoso (artigo 1000/B). As concentrações dos analitos nos calibradores dependem do lote. Os níveis exatos são fornecidos no folheto acompanhante.

Injete repetidamente uma alíquota do calibrador de urina preparado ou do calibrador aquoso até que dois cromatogramas sucessivos sejam aproximadamente idênticos em termos de tempos de retenção, resolução de pico e áreas e alturas de pico. Utilize o cromatograma da última injeção de teste para calibração do sistema de análise (software para PC, integrador).

Para verificar se as condições de HPLC (tempos de retenção, parâmetros de calibração) permaneceram constantes durante a análise, injete novamente o calibrador durante e no final de uma série de amostras. Selecione o método de padrão interno para calibração em seu sistema de análise.

7.2 Quantificação com Padrão Interno

A utilização de um padrão interno permite compensar potenciais perdas durante a preparação da amostra. Uma quantidade conhecida do padrão interno é adicionada a cada amostra (calibrador, controles, amostras de pacientes). O PC ou integrador recebe o pico apropriado (para análise VMA/HVA/5-HIAA iso-VMA e HICA no cromatograma do calibrador) da execução de calibração como padrão interno.

Concentrações do padrão interno nas soluções:

Iso-VMA (artigo 1004/B): 0.50 µg/mL

HICA (artigo 51003/B): 10.0 µg/mL

Exemplo: São adicionados 1,0 ml de padrão interno (0.5 ng/mL iso-VMA) em 50 µl de urina. A concentração final de padrão interno na amostra é de 10 µg/mL (= 10 mg/L) iso-VMA.

Com HICA-ISTD:

São adicionados 50 ml de padrão interno (10 ng/mL HICA; ver cap. 6.6, 6.7) em 50 µl de urina. A concentração final de padrão interno na amostra é de 10 µg/mL (= 10 mg/L) HICA.

No software, colocar "10 mg/l" como concentração do padrão interno nas amostras de urina a serem quantificadas.

Para cálculo da excreção em 24h de metabólitos das catecolaminas os dados devem ser multiplicados pelo volume da urina em litros. O calibrador e o padrão interno são rastreáveis a substâncias de referência compradas de um fornecedor certificado.

8 Controle de Qualidade

Os controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema (controles Chromsystems nº 0040 e 0050).

Se as análises desses controles fornecerem resultados fora da média dada no folheto de informações, o sistema deve ser checado e, se necessário, recalibrado.

9 Valores de referência

As faixas de referência para aminas biogênicas variam consideravelmente e são altamente dependentes da idade e do gênero. Nós recomendamos a determinação de faixas específicas de referência para cada laboratório.

Tabela 5: Faixas de referência da literatura [4]

Coletivo de paciente	Faixa de Referência VMA	HVA	5-HIAA
Crianças			
0-2 semanas	0-850 µg/24h	0-1500 µg/24h	-
2-8 semanas	0-1300 µg/24h	0-2000 µg/24h	-
2-6 meses	0-1500 µg/24h	0-2900 µg/24h	-
7-12 meses	0-1700 µg/24h	0-3400 µg/24h	-
1-5 anos	0-2200 µg/24h	0-4800 µg/24h	-
6-10 anos	0-3600 µg/24h	0-6900 µg/24h	-
11-15 anos	0-4800 µg/24h	0-8800 µg/24h	-
Adultos	1600-7300 µg/24h	1800-6900 µg/24h	< 8200 µg/24h

Tabela 6: Faixas de referência da literatura [6]

Coletivo de paciente	Faixa de Referência VMA	HVA	5-HIAA
Crianças			
0-1 ano	≤ 18800 µg/g creatinina	≤ 32600 µg/g creatinina	-
2-4 anos	≤ 11000 µg/g creatinina	≤ 22000 µg/g creatinina	-
5-9 anos	≤ 8300 µg/g creatinina	≤ 15100 µg/g creatinina	-
10-19	≤ 8300 µg/g creatinina	≤ 7600 µg/g creatinina	-
Adultos	≤ 5500 µg/g creatinina	1800-6900 µg/24h	2000-8000 µg/24h

Tabela 7: Faixas de referência da literatura [8]

Coletivo de paciente	Faixa de Referência VMA	HVA
Crianças		
0-3 meses	3000-18900 µg/24h	640-35000 µg/24h
3-6 meses	2900-21800 µg/24h	12500-32100 µg/24h
6-12 meses	4900-16900 µg/24h	9000-31400 µg/24h
1-2 anos	2500-15500 µg/24h	5700-27300 µg/24h
2-5 anos	2100-10300 µg/24h	2700-23500 µg/24h
5-10 anos	1100-7600 µg/24h	1100-16500 µg/24h
10-15 anos	1000-5600 µg/24h	1100-9700 µg/24h
15-20 anos	700-21800 µg/24h	1400-5800 µg/24h
20-25 anos	400-4300 µg/24h	600-5200 µg/24h

Nota:

As faixas de referência citadas aqui são retiradas da literatura e são somente consultivas. Favor notar que não há faixas de referência universais para aminas biogênicas em urina. Os resultados obtidos usando diferentes métodos de testes não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método usado para análises para permitir a interpretação acurada dos resultados.

10 Fatores de conversão

A seguinte tabela lista os fatores de conversão entre massa e concentração molar e vice-versa.

Tabela 8: Fatores de conversão

Substância analisada	mg/l para $\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$ para mg/l
VMA	x 5.04	x 0.198
HVA	x 5.49	x 0.182
5-HIAA	x 5.23	x 0.191

11 Armazenamento e validade dos reagentes

Reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de transporte e estocagem indicadas no rótulo sejam obedecidas. Transporte e armazene de acordo com as seguintes condições:

Tabela 9: Condições de transporte para o kit de reagentes

Produto	Temperatura de transporte
Kit de reagente (artigo 1000/B)	+18 a +30°C

Desempacote imediatamente os reagentes após o transporte e armazene individualmente como definido abaixo:

Tabela 10: Condições de armazenamento dos reagentes

Produto	Armazenamento
Fase Móvel (artigo 1011, 1012)	+18 a 30°C
Padrão de Calibração aquoso (artigo 1003/B)	+2 a +8° C
Padrão de Calibração em Urina (artigo 1009)	+2 a +8° C
Padrão Interno (artigo 1004/B)	+2 a +8° C
Tampão de Lavagem 1 (artigo 1005)	+18 a 30°C
Tampão de Lavagem 2 (artigo 1006)	+18 a 30°C
Tampão de Eluição (artigo 1077)	+18 a 30°C
Finalizador (artigo 1013)	+18 a 30°C
Controles em urina nível I e II (artigos 0040, 0050)	+2 a +8 °C

Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido estabelecido anteriormente, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2, 5.3 e 5.4 deste Manual.

12 Descarte de resíduos

A Fase Móvel contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo livre de halogênios.

O Finalizador é uma base forte, e o Tampão de Eluição é um ácido forte. Neutralize os resíduos dos produtos e descarte em um recipiente para soluções salinas.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles e calibradores, devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com a diretiva 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

13 Exemplos de cromatogramas

Os seguintes gráficos fornecem alguns exemplos de cromatogramas criados com o uso deste método.

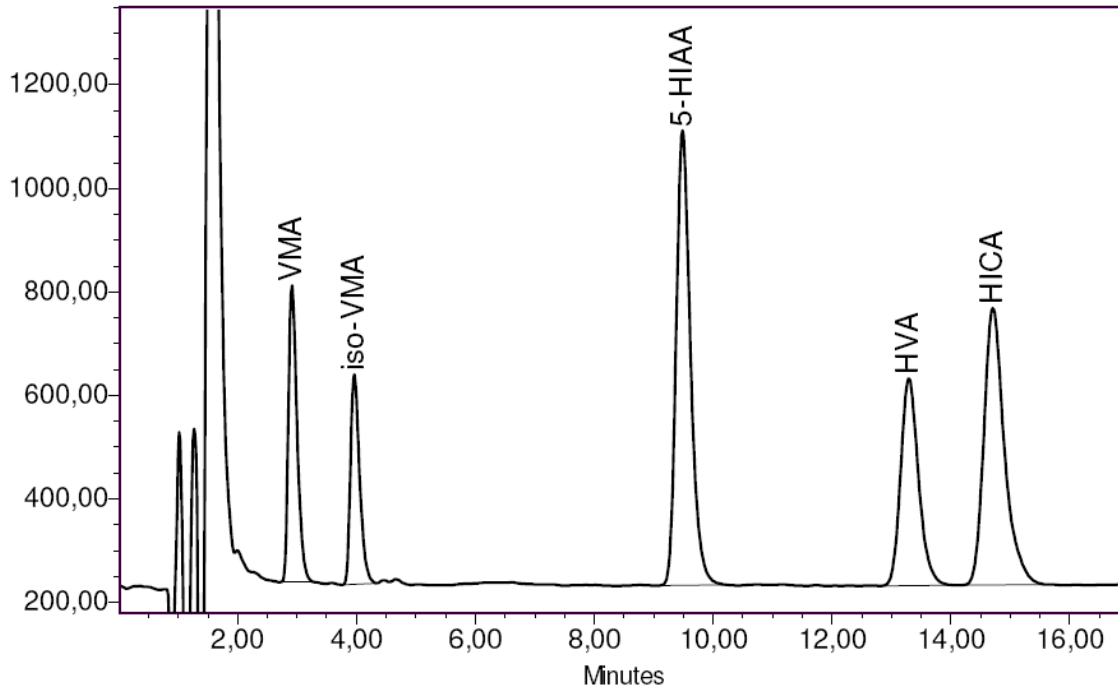


Figura 5: Cromatograma de um calibrador (iso-VMA e HICA como padrão interno); fluxo de 1.0 ml/min. Concentração dos analitos: VMA: 0.25 mg/l; 5-HIAA: 0.25 mg/l; HVA: 0.25 mg/l

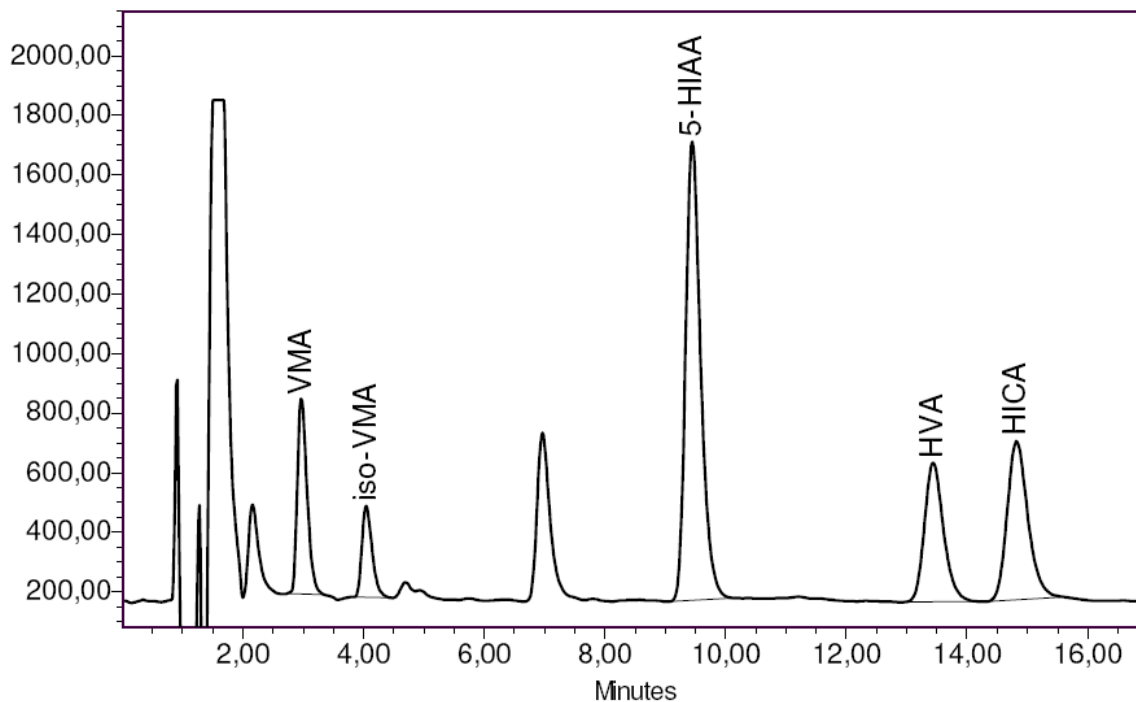


Figura 6: Cromatograma de um controle de urina (iso-VMA e HICA como padrão interno); fluxo: 1.0 ml/min. Concentração dos analitos: VMA: 15.5 mg/l; 5-HIAA: 21.5 mg/l; HVA: 14.1 mg/l

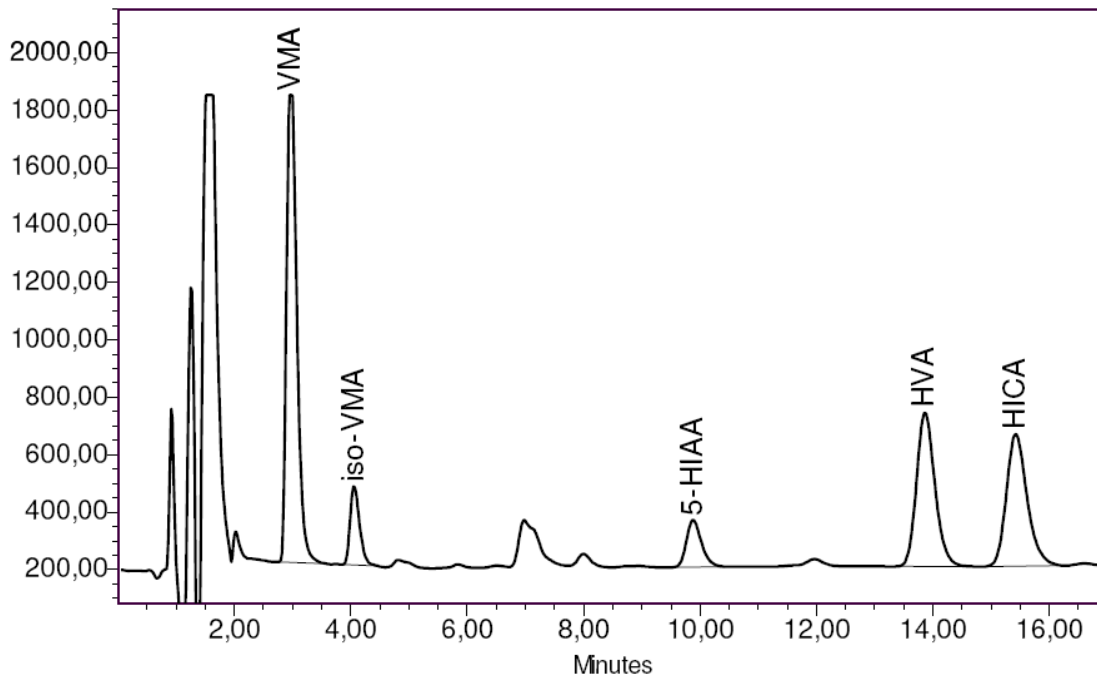


Figura 7:
Cromatograma de amostra de paciente (isso-VMA e HICA como padrão interno); fluxo: 1.0 ml/min.
Concentração dos analitos: VMA: 46.3 mg/l; 5-HIAA: 2.8 mg/l; HVA: 21.0 mg/l

14 Limitações Clínicas

Não há faixas de referências universais aplicáveis para os analitos do kit de reagente de VMA, HVA, 5-HIAA em urina. Os resultados obtidos usando diferentes métodos de teste não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método usado para análise para permitir uma interpretação acurada dos resultados.

Os usuários devem especificar suas próprias faixas de referência baseados em avaliação clínica. Fatores de conversão entre diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever resultados para um paciente específico.

15 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Linha de base instável	Sistema de HPLC contaminado com substância eletroquimicamente ativa	Procedimento de peroxidação passiva com ácido nítrico, incluindo bomba, tubulações e sistema de injeção
	Rachaduras no diafragma	Substituir o adaptador de Teflon
	Depósito de substâncias no diafragma do sistema de referência	Limpar o diafragma com amônia 25% ou substituir
Flutuação rítmica da linha de base	Desgaste de unidades da bomba de HPLC	Checar vazamentos na bomba e chamar o serviço técnico se necessário
	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar o eletrodo de trabalho
	Danos no interior da célula de detecção	Substituir a célula ou chamar o serviço técnico
	Vazamento na célula do detector	Checar vazamentos na célula e cuidadosamente realizar pequenos ajustes ou substituir peças desgastadas
	Bolhas de ar na bomba	Checar a bomba, remover bolhas de ar do sistema
Ruídos de linha de base	Sistema não está equilibrado	Recircular a fase móvel por um período maior
	Alteração de temperatura ambiente	Fornecer temperatura ambiente constante, coluna do termostato se ocorrerem grandes variações frequentes de temperatura
Corrente de fundo elevada	Sistema de HPLC contaminado com substância eletroquimicamente ativa	Procedimento de peroxidação passiva com ácido nítrico, incluindo bomba, tubulações e sistema de injeção
	Fase móvel contaminada	Substituir a fase móvel
	Coluna de HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar o eletrodo de trabalho
Perda de sensibilidade do sinal ou perda de sinal	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar o eletrodo de trabalho
	Falha no potencial de trabalho	Verificar o potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência; se estiver muito

baixo, acionar o serviço técnico

Problema	Possível causa	Solução
Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura ambiente	Usar forno para coluna
	Fluxo irregular	Checar bomba de HPLC (vazamentos, bolhas de ar). Medir o fluxo, se estiver irregular checar o sistema para bolhas; chame a assistência se necessário
Picos duplos	Volume morto nas junções e tubulações	Refazer junções e substituir tubulações
	Volume morto na coluna de HPLC	Substituir a coluna
	Volume morto no sistema de injeção	Verificar <i>loop</i> de injeção e falhas em peças do sistema
Presença de picos interferentes	Sistema de injeção contaminado	Lavar o sistema de injeção com água, seguido de isopropanol; para a limpeza de injetores manuais, girar a válvula frequentemente durante a limpeza. Na limpeza de amostrador automático, ativar o processo de injeção várias vezes, seguindo a orientação contida no manual do equipamento
	Seringa de injeção contaminada	Lavar a seringa com isopropanol e água; lavar com ácido nítrico 15-20% se necessário
	Sistema contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Procedimento de peroxidação passiva com ácido nítrico, incluindo bomba, tubulações e sistema de injeção
	Coluna contaminada	Substituir a coluna
	Peças de material inadequado no sistema de injeção	Substituir válvulas e selos de injeção feitos de Vespel® por materiais feitos de Tefzel®
Picos com ombros	Volume morto na coluna de HPLC	Substituir a coluna
Picos com cauda (<i>Tailing</i>)	Coluna de HPLC muito velha	Substituir a coluna
Alta pressão na coluna	Acúmulo de partículas na pré-coluna ou na própria coluna	Trocar o cartucho da pré-coluna ou a própria coluna

Sistema de injeção obstruído

Enxágue o sistema de injeção com água, depois com isopropanol e novamente com água

16 Literatura

1. Lattke P, Peitzsch M, Därr R, Siegert G, Eisenhofer G. (2013) Labordiagnostik Katecholamiproduzierender Tumoren. *J Lab Med* **37**(4): 187-97.
2. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. (2003) Vom Karzinoid zum neuroendokrinen Tumor. *Dtsch Arztebl* 100:A 1932-42.
3. Eisenhofer G, Peitzsch M. (2014) Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem* **60**(12): 1486-99.
4. Gressner AM, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).
5. Grouzmann E, Lamine F. (2013) Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(5): 713-23.
6. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
7. Feldman JM. (1986) Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem* **32**(5):840-4.
8. Pussard E, Neveux M, Guigueno N. (2009) Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood. *Clin Biochem* 42(6):536-9.

Apêndice I: Preparo automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™

ASPEC™_Racks

Os arquivos Chromsystems ASPEC™ para VMA, HVA e 5-HIAA em urina requerem as seguintes estantes de amostras e reagentes:

- Estante de amostras, código 28
- Estante de solventes, código 61
- Estantes móveis DEC, código 101 (até 3), com vials de coleta e estantes de coleta adequados

Configurando as estantes:

Reagente	Estante	Posição
Amostras	Estante de amostras	1-52
Vials vazios	Estante de amostras	55-106 (mesmos números das amostras)
Finalizador (1013/A)	Estante de amostras	107-108
Padrão Interno (1044/B/A)	Estante de solventes	109
Tampão de Lavagem 1 (1005/A)	Estante de solventes	110
Tampão de Lavagem 2 (1006/A)	Estante de solventes	111
Tampão de Eluição (1077/A)	Estante de solventes	112
Colunas de preparação de amostras (1008/A)	Estantes DEC	113-120
Vials de Coleta	Estante de coleta	Mesmos números dos cartuchos SPE
Água destilada	Reservatório	

Opção:

Para posterior melhora da análise de 5-HIAA, HICA (artigo 51303/B) pode ser usado como padrão interno adicional. Neste caso, os ajustes das estantes devem ser modificados de acordo com a seguinte tabela:

Reagente	Estante	Posição
Amostras	Estante de amostras	1-51
Vials vazios	Estante de amostras	55-105 (mesmos números das amostras)
Padrão Interno (HICA; 51303/B)	Estante de amostras	106
Todos os outros itens como acima	Solvente, DEC, estantes de coleta	Como acima

Antes de se iniciar uma sequência de análises, o diluidor deve ser lavado manualmente com solvente do reservatório (Menu Manual – Prime dilutor)!

Volumes de reagentes requeridos:

Para **cada amostra**, os seguintes volumes de reagentes são requeridos:

Reagente	Volume
Finalizador (1013/A)	100 µl*
Padrão Interno (1044/B/A)	1.0 ml
Tampão de Lavagem 1 (1005/A)	2.0 ml

Tampão de Lavagem 2 (1006/A)	4.0 ml
Tampão de Eluição (1077/A)	2.0 ml
<i>Se usado:</i>	
Padrão Interno (HICA; 51303/B)	50 µl

Cada garrafa de solvente deve conter o volume de solvente suficiente para o número de amostras a ser preparada **mais** um volume adicional de aproximadamente 30 ml.

- Para o finalizador: Dependendo do número de amostras, primeiro complete o vial número 107 com até 3.5 ml. Se mais de 35 amostras forem processadas, complete com o volume adicional requerido de finalizador no vial número 108.

Princípio dos arquivos de trabalho do ASPEC™

O ASPEC™ mistura 50µl de cada espécimen de urina com 1.0ml de Padrão interno em um novo vial vazio. O Padrão Interno contém um tampão para diluição e ajuste de pH, dessa forma, **não é necessária nenhuma correção de pH antes da extração!**

A urina diluída é então submetida ao preparo de amostra completo (SPE com as etapas de lavagem e eluição). Os eluatos obtidos estão prontos para injeção no sistema de HPLC.

O disco de arquivos de trabalho contém os seguintes arquivos:

“VMA”:

ASPEC™ deve ser adequadamente conectado ao sistema de HPLC! Este arquivo controla o preparo completo de amostras para VMA, HVA e 5-HIAA em urina. Os eluatos preparados são automaticamente injetados no sistema de HPLC, e a cromatografia é iniciada. Durante a corrida de HPLC as próximas amostras são preparadas.

O volume de injeção é ajustado para 20 µl; isto pode ser alterado na etapa #19 – INJECT.

A etapa #21- WAIT da programação é usada para coordenar os intervalos de injeção de acordo com o tempo de corrida do cromatograma e o tempo de preparação das amostras; isto deve ser alterado se necessário.

“VMA_H”:

O mesmo que para “VMA”, mas HICA é usado como padrão interno adicional para a análise de 5-HIAA. Etapa INJECT é em #21
A etapa WAIT para adaptação do tempo de corrida da cromatografia é em #23

“VMA_N”/“V_H_N”:

ASPEC™ realiza somente o preparo de amostras, as amostras **não** são injetadas no sistema de HPLC!

Ajustes de configuração:

Estes arquivos de trabalho são designados para controle do ASPEC™ via teclado.

Alguns itens no menu CONFIG devem ser checados e, se necessário, adaptados a atual configuração do equipamento ASPEC™.

Configuração do SAMPLER:

Model

Arm

Rinsing station depth: e.g. 80mm

Rinsing station positions: A and/or B, C

Injection loop(s): position and volume

Calib. tubing volume

ID number

Configuração do DILUTOR

Type

Left syringe volume


Right syringe volume

Transfer tubing

ID number

Apêndice II: Informações de segurança

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nos respectivos folhetos de segurança dos materiais (www.chromsystems.de) ou mediante solicitação.

Produto	Risco
Fase Móvel (artigo 1011,1012)  	Perigo H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode causar danos aos órgãos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.
Tampão de Eluição (artigo 1077) 	Perigo H315 Irritante à pele. H319 Irritante aos olhos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando.
Finalizador (artigo 1013) 	Perigo H290 Pode ser corrosivo a metais. H314 Causa queimaduras severas e danos aos olhos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos, lavar cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P309+P311 Em caso de acidente ou mal-estar, procurar auxílio médico imediatamente. P301+P330+P331 Se ingerido, lave a boca e não induza ao vômito.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Padrão de calibração (artigo 1003/B) Padrão de calibração em urina (artigo 1009) Padrão interno (artigo 1004/B) Tampão de lavagem 1 e 2 (artigos 1005 e 1006) Padrão Interno HICA (artigo 51303/B) Mix de otimização de potencial (artigo 1099) Controles endócrinos de urina (artigos 0040 e 0050)	

Apêndice III: Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

Área ou altura do pico de:	Abreviação
Substância A (ex. VMA) no cromatograma da amostra	= A_{Amostra}
Substância A (ex. VMA) no cromatograma do padrão de calibração	= $A_{\text{Padrão}}$
Padrão Interno (ex. iso-VMA) no cromatograma da amostra	= IS_{Amostra}
Padrão Interno (ex. iso-VMA) no cromatograma do padrão de calibração	= $IS_{\text{Padrão}}$

A concentração $C_{\text{Análise, Amostra}}$ na amostra é então calculada como a seguir:

$$C_{\text{Análise, Amostra}} \text{ (mg/L)} = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Padrão}}}{A_{\text{Padrão}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times \text{fator} \times 40$$

Sendo os fatores das substâncias:

VMA: 0,25

HVA: 0,25

5-HIAA: 0,25

HICA: 0,25

Cálculo da recuperação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área ou altura do pico Iso-VMA no cromatograma da amostra}}{\text{área ou altura do pico Iso-VMA no cromatograma do calibrador}} \times 100$$

Nota: a avaliação quantitativa do 5-HIAA requer recuperação maior de 50%. Para melhorar a determinação de 5-HIAA com HIAA como padrão interno veja o cap. 5.5.2.

Apêndice IV: Validação

Para avaliar a linearidade e validação do método, as amostras de urina foram enriquecidas com quantidades definidas de VMA, HVA e 5-HIAA. Múltiplas alíquotas dessas preparações passaram pelo procedimento de preparação da amostra.

Recuperação

A recuperação foi determinada a partir do *slope* das curvas de calibração de amostras de urina e soluções padrões diluídos:

Tabela 16: Taxas de recuperação

Substância analisada	Recuperação
VMA	70%
HVA	82%
5-HIAA	66%
Padrão Interno (iso-VMA)	78%
Padrão Interno (HICA)	72%

Linearidade e limite de quantificação

O método é linear a partir do limite de quantificação (LLOQ) designado até o limite superior (faixa linear):

Tabela 19: Limite de quantificação e linearidade

Analito	LLOQ, aprox.*	Limite de quantificação (até pelo menos)
VMA	0.2 mg/l	78 mg/l
HVA	0.2 mg/l	51 mg/l
5-HIAA	0.2 mg/l	76 mg/l

*O limite de quantificação depende das condições do eletrodo de trabalho.

Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n = 10) e determinação das concentrações dos analitos de mesmo espécime em 3 concentrações diferentes:

Tabela 18: Precisão intra-ensaio

Substância analisada	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
	n = 10	n = 10	n = 10
VMA	0.6% (4,56 mg/l)	0.8% (16.0 mg/l)	1.3% (9.79 mg/l)
HVA	1.1% (4,49 mg/l)	1.0% (13.5 mg/l)	1.3% (8.98 mg/l)
5-HIAA	3.8% (3.34 mg/l)	1.7 (11.4 mg/l)	3.0% (6.84 mg/l)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de 4 preparos e da determinação das concentrações dos analitos em pool de urina (níveis normais e patológicos) em 20 séries de testes em duplicata.

Substância analisada	Coeficiente de variação (concentração do analito)	
	n = 80	n = 80
VMA	2.1% (4.51 mg/l)	2.0 % (15.5 mg/l)
HVA	1.9 % (4.38 mg/l)	1.8 % (13.1mg/l)
5-HIAA	4.5 % (3.98 mg/l)	4.2 % (12.3 mg/l)

Apêndice V: Declaração de Conformidade

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

COPY

EC-Declaration of Conformity
according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer
Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the HPLC determination of:

GMDN Code 60606, term "HVA/VMA/5HIAA IVD, kit, liquid chromatography"

EDMA Nomenclature term: Vanillylmandelic acid
EDMA Nomenclature code: 12-09-02-17-00
IVDD Classification: other product

Reagent Kit: **1000/B – VMA, HVA und 5-HIAA in Urine**
Calibrators: **1009 – Urine Calibration Standard**
1003/B – Calibration Standard
Controls: **0040 – Endocrine Urine Control, Normal Range**
0050 – Endocrine Urine Control, Pathological Range

meet all applicable requirements of the directive 98/79/EC.

Conformity assessment procedure: Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:
EN ISO 13485, EN 13612, EN 13641, EN ISO 14971, EN 18113-1, EN 18113-2,
EN 15223-1, EN 17511, EN 23640

Notified body: –

Gräfelfing, April 11th, 2019


 Michael Meier
 Managing Director

EC declaration valid until May 26th, 2022

Vers. 3.0

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

Telefon: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199











mailto:me@chromsystems.com
www.chromsystems.com


 Das System ist zertifiziert nach:
 DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO 13485, ISO 13485:2016

Apêndice VI: Símbolos

Nós usamos símbolos EN ISO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e embalagens. O significado de cada símbolo é apresentado na tabela abaixo:

Tabela 22: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Usado por
	Número de referência
	Número do lote
	Veja instruções de uso
	Limite superior de temperatura: Armazene abaixo de determinada temperatura
	Limite de temperatura: Armazene dentro de determinada faixa de temperatura
	Suficiente para <n> aplicações
	Ferramenta de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de série