

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 Metanefrinas em Urina

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Metanefrinas em urina por HPLC.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 2020

METANEFRINAS EM URINA POR HPLC MS 10350840132

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 – 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

Conteúdo	3
1 Informações gerais	4
2 Introdução	5
3 Teoria da detecção eletroquímica.....	6
3.1 Princípios gerais	6
3.2 Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica	6
3.3 Otimização do potencial de trabalho	7
4 Sistema de HPLC.....	8
4.1 Instalando o equipamento	8
4.2 Parâmetros cromatográficos.....	8
4.3 Coluna cromatográfica.....	9
4.4 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC.....	9
4.4.1 Bomba e tubulações	9
4.4.2 Eletrodo de trabalho	10
4.4.3 Eletrodo de referência	10
4.4.4. Evitando flutuações de fluxo da bomba	10
4.4.5. Desligando o equipamento	10
5 Preparo da amostra	11
5.1 Coleta e armazenamento de amostras de urina	11
5.2 Reconstituição do padrão de calibração em urina	11
5.3 Reconstituição dos controles.....	11
5.4 Hidrólise ácida das amostras de urina	12
5.5 Extração da amostra.....	12
5.6 Procedimento de preparo da amostra	12
5.7 Prazo de validade das amostras preparadas	13
6 Resultados e avaliação	13
6.1 Calibração dos dados do sistema de análise	13
6.2 Quantificação com Padrão Interno	14
7 Controle de Qualidade	14
8 Valores de referência	15
9 Fatores de conversão	15
10 Armazenamento e validade dos reagentes	16
11 Descarte de resíduos.....	16
12 Exemplos de cromatogramas	17
12.1 Cromatograma de um padrão de calibração	17
12.2 Cromatograma de um controle de urina (nível patológico)	17
12.3 Cromatograma de um paciente.....	18
12.4 Cromatograma de um paciente com padrão interno alternativo (artigo 2024/HR).....	18
13 Interferentes conhecidos.....	19
14 Problemas e Soluções	19
15 Literatura	21
Apêndice I: Preparo Automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™	22
Apêndice II: Informações de segurança	24
Apêndice III: Cálculo manual	25
Apêndice IV: Validação.....	26
Apêndice V: Declaração de Conformidade	27

1 Informações gerais

Nº do artigo	Produto	
2020	Kit de reagentes para análise por HPLC de Metanefrinas em urina. Para 100 análises.	
	Componentes do Kit:	
	Fase móvel	1000 ml
	Padrão de calibração	10 ml
	Padrão Interno	10 ml
	Solução tampão de neutralização	2 x 300 ml
	Tampão de lavagem	2 x 250 ml
	Solução tampão de eluição	2 x 250 ml
	Colunas de preparação de amostras	100 unid
	Componentes disponíveis separadamente:	
2021	Fase móvel	1000 ml
2022	Fase móvel	10 x 1000 ml
2023	Padrão de calibração	10 ml
2009	Padrão de calibração liofilizado em urina	5 x 5 ml
2024	Padrão Interno	10 ml
2044/HR	Padrão Interno / Alta Resolução	10 ml
2025	Solução tampão de neutralização	300 ml
2026	Tampão de lavagem	250 ml
2027	Solução tampão de eluição	250 ml
2028	Colunas de preparação de amostras	100 unidades
	Acessórios	
2120	Coluna de HPLC, equilibrada e certificada	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro	1 peça
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
18002	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
2010	Tubos com tampa de rosca	50 peças
2099	Mix de interferência para metanefrinas	10 ml
	Controles (liofilizados)	
0040	Controle endócrino em urina, nível normal	10 x 8 ml
0050	Controle endócrino em urina, nível patológico	10 x 8 ml

2 Introdução

As aminas biogênicas normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina, que são a maioria dos metabólitos do metabolismo da catecolamina (ver figura 1), são parâmetros importantes para o diagnóstico de feocromocitoma, neuroblastoma, ganglioneuroma e melanoblastoma. Sua análise, em conjunto com a noradrenalina, dopamina, ácido vanililmandélico e ácido homovanílico, reduz substancialmente o risco de resultados falso positivos.

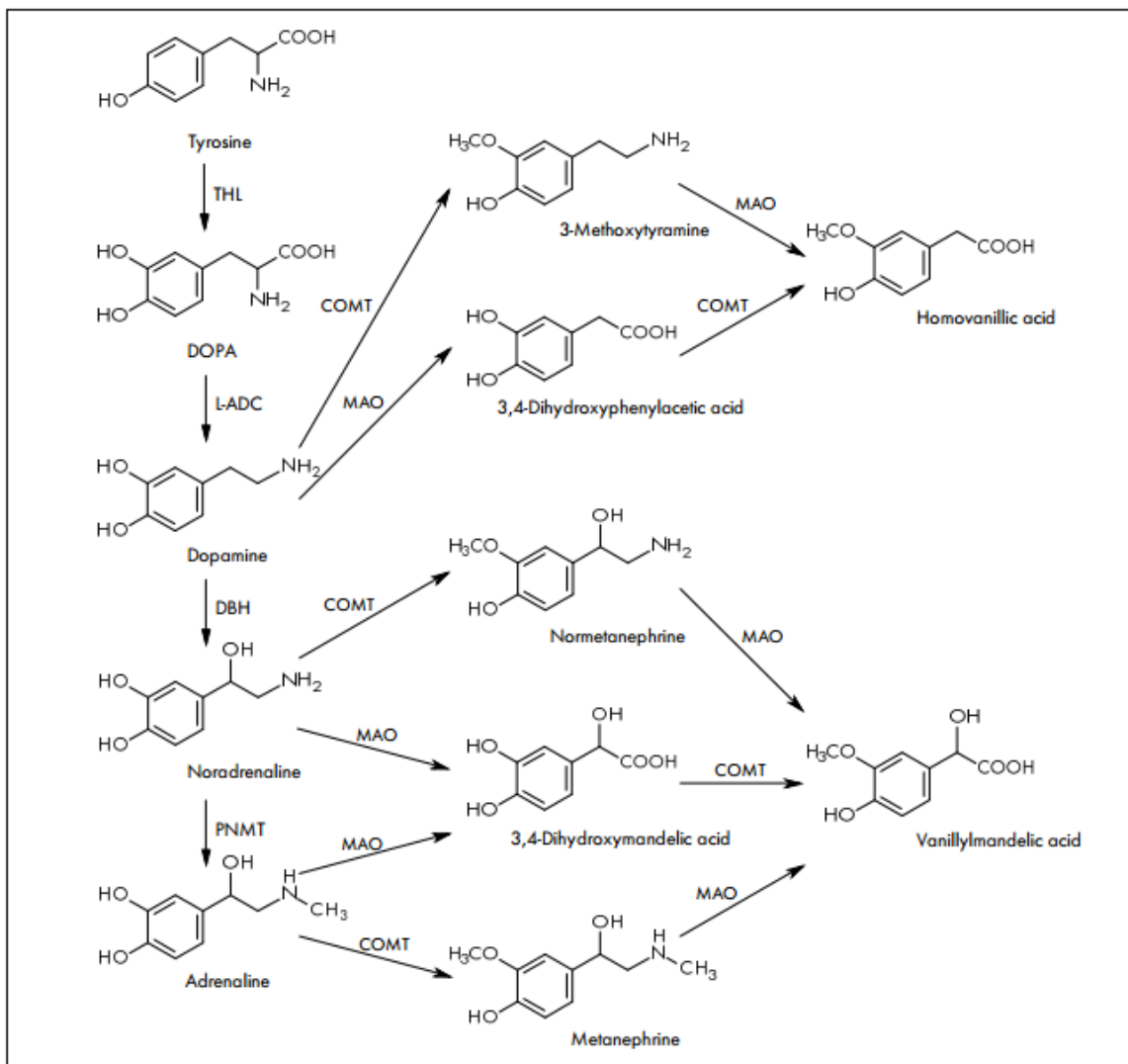


Figura 1 – Metabolismo das Catecolaminas e Metanefrinas

Uso específico:

O kit de reagentes de metanefrinas em urina da Chromsystems é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para detecção quantitativa de metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina em amostras de urina de pacientes através de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detecção eletroquímica. Foi desenvolvido como teste de monitoração de pacientes com suspeita de tumores secretores de catecolaminas.

Princípio do kit:

Esse kit foi designado para uma determinação confiável de normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina na urina. As metanefrinas estão presentes na urina em forma de conjugados com glucoronido e sulfato sendo aplicada uma etapa inicial de hidrólise ácida para obtenção da sua forma desconjugada. A diluição subsequente da amostra hidrolisada com o tampão de neutralização ajusta o pH para a subsequente extração em fase sólida. O ajuste correto do valor do pH é verificado pela alteração de cor do amarelo para o roxo. A determinação cromatográfica é

uma corrida em um sistema isocrático de HPLC com detector eletroquímico. Uma coluna otimizada de HPLC e a fase móvel garantem uma separação segura de possíveis interferências.

3 Teoria da detecção eletroquímica

3.1 Princípios gerais

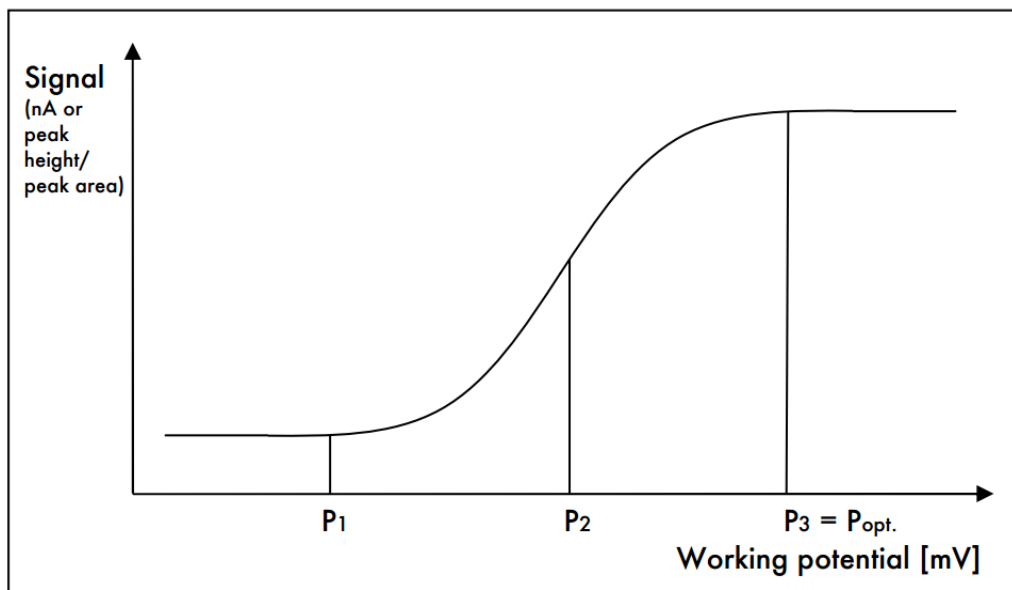
A técnica de medição eletroquímica mais empregada na cromatografia líquida é a amperométrica, com potencial de trabalho constante. Os detectores amperométricos convencionais utilizam uma célula com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar.

O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. O eletrodo auxiliar atua na manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente no eletrodo de referência. Qualquer substância eletroquimicamente ativa que passe através da célula de detecção será oxidada ou reduzida. As transformações por oxidação ou redução de tal substância geram uma perda ou ganho de elétrons, resultando em uma corrente elétrica que pode ser detectada e medida pelo instrumento, amplificada e registrada como um 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 do eletrodo de trabalho pode ser verificada na figura abaixo.



Correlação entre potencial de trabalho e detector de sinal.

Analisando o gráfico anterior, pode-se observar que em um potencial igual ou menor do que P₁ a energia disponível é insuficiente para a transformação das moléculas de uma determinada substância, quando em contato com a superfície do eletrodo de trabalho. Aumentando o potencial para P₂, a energia disponível aumenta proporcionalmente, de forma que uma parte das moléculas são transformadas quando alcançam o eletrodo de

trabalho. Já no potencial P_3 , a energia é suficiente para transformar todas as moléculas da substância analisada. A partir desse ponto, nenhum acréscimo de sinal é obtido com o aumento do potencial. O sinal de detecção passa a ser dependente somente da concentração da substância analisada (platô de difusão controlada).

Uma vez que nenhum acréscimo de sinal é possível após alcançar o platô, não é necessário medir o sinal em potenciais maiores do que P_3 . De fato, em potenciais maiores, a seletividade da análise fica comprometida, e um número cada vez maior de substâncias interferentes pode ser transformada eletroquimicamente.

3.3 Otimização do potencial de trabalho

Um potencial de trabalho correto é de grande importância para a seletividade da análise eletroquímica e também deve ser otimizado ao longo do tempo para garantir a sensibilidade máxima e mínima interferência.

Experiências têm demonstrado que a curva de potencial de trabalho versus sinal cromatográfico 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 metanefrinas em urina é utilizado uma solução aquosa padrão (artigo 2023).

O seguinte procedimento para otimização é recomendado:

1. Ajuste o potencial de trabalho em +740 mV e injete o padrão de calibração (artigo 2023) Determine a área ou a altura do pico no cromatograma obtido.
2. Aumente o potencial de trabalho em 40mV. Injete novamente o padrão de calibração (artigo 2023) e determine a área ou a altura do pico.
3. Se a área ou a altura aumentar em mais de 15%, repita a etapa 2 do procedimento. Caso a área ou a altura não se altere significativamente, reduza o potencial em 40mV.

Mantenha esse cromatograma como referência.

O potencial de trabalho obtido por este método geralmente encontra-se entre +780 mV e +840 mV (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 análise o padrão de calibração deve ser injetado e o cromatograma resultante deve ser comparado com o cromatograma de referência. Se houver diferenças significativas o potencial de trabalho deve ser re-otimizado.

Como regra base de otimização do potencial de trabalho podem ser consultadas as relações entre as alturas dos picos no padrão de calibração aquoso (artigo 2023). Com o potencial ajustado corretamente o pico do padrão interno é o duas vezes mais alto do que pico da normetanefrina (primeiro pico do cromatograma após o pico de injeção). Essa regra só serve para controlar se o potencial estiver ajustado muito baixo. Se o potencial estiver ajustado muito alto, podem ocorrer picos de interferência no cromatograma. A figura abaixo mostra a otimização do potencial de trabalho graficamente.

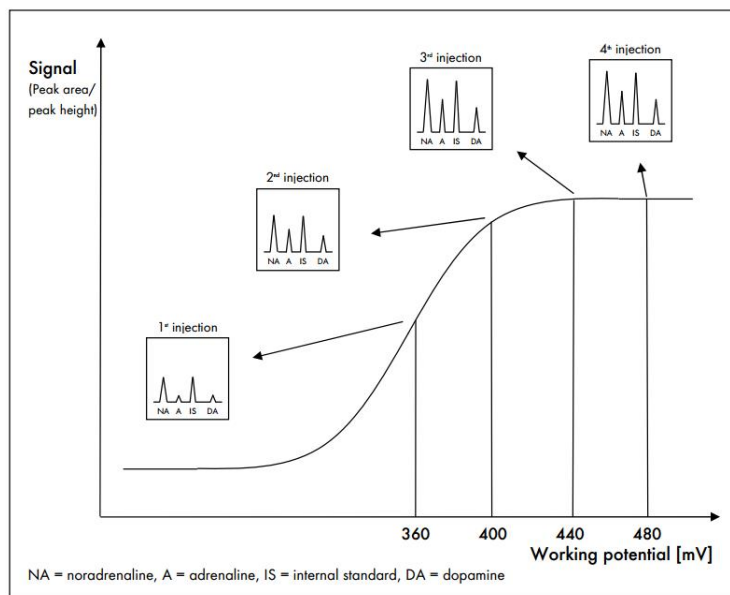


Figura 3 – Otimização do potencial de trabalho

4 Sistema de HPLC

Atenção: Antes de utilizar os reagentes do Kit, favor verificar as informações de segurança contidas no capítulo 10 deste manual.

4.1 Instalando o equipamento

Conecte a coluna analítica na direção correta do fluxo da bomba de HPLC. Permita que aproximadamente 20 mL de fase móvel passe através da coluna, com um fluxo de 1 mL/min. Em seguida, conecte a tubulação de saída da coluna na entrada do detector. Não é necessário desgaseificar a fase móvel antes do uso. Quando o sistema estiver equilibrado, e a variação de corrente da linha de base seja menor do que 5 nA, a fase móvel pode ser colocada no modo de recirculação. (pela tubulação de saída da coluna até o frasco da fase móvel).

Recomenda-se uma mistura de água ultrapura com 5-10% de metanol como solução de limpeza do sistema de injeção do equipamento de HPLC.

Para maiores informações sobre a operação do sistema de HPLC e outros cuidados necessários, favor consultar os manuais apropriados do fabricante do equipamento.

4.2 Parâmetros cromatográficos

Detector:

Selecione um potencial de trabalho para a detecção eletroquímica das metanefrinas correspondente ao valor de platô determinado experimentalmente (ver seção 3.3). Para a detecção de metanefrinas e de HMBA (padrão interno) o valor do potencial de trabalho geralmente está entre +780 e +840 mV (com eletrodo de referência de Ag/AgCl). Após equilíbrio, o valor de corrente da linha de base não deve exceder 5 nA.

Separação cromatográfica:

Razão do fluxo: 1,0 a 1,2 ml/min.

Temperatura da coluna: ambiente (aprox. 25°C).

A separação cromatográfica pode ser conduzida em temperatura ambiente, mas a temperatura deve ser mantida o mais constante possível para evitar variação nos tempos de retenção. Se for necessário ajustar a razão do fluxo ou usar um forno de coluna.

Analito	Tempo de retenção (aprox. min.) (razão do fluxo 1,0 ml/min.)
Normetanefrina	5.5
Metanefrina	7.0
Padrão Interno (HMBA)	8.4
3-Metoxitiramina	12.5

O tempo total de análise é de cerca de 14 minutos. Se for utilizado um novo lote de fase móvel ou se a coluna for substituída, o tempo de retenção pode alterar levemente. Entretanto, o tempo de retenção deve ser adaptado apropriadamente.

Verificando a eficiência da separação:

Para monitorar a eficiência da separação do sistema, recomenda-se realizar uma análise teste antes da análise das amostras de urina. Para tanto, uma alíquota do padrão de calibração é injetada repetidamente no sistema de HPLC. Além de servir para calibrar o sistema e ajustar corretamente os parâmetros de integração, essas injeções do padrão permitem o cálculo de alguns parâmetros cromatográficos, tais como resolução entre os picos analisados, número de pratos teóricos do pico de interesse e outros fatores que servem de base para comparação com outros cromatogramas obtidos ao longo do tempo de uso do Kit.

A última injeção pode ser usada para calibração.

4.3 Coluna cromatográfica

A coluna para HPLC utilizada na análise das metanefrinas é fornecida equilibrada (pronto para uso) e testada. **Não deve ser tratada com nenhuma outra solução antes do uso.** O valor da pressão de uma coluna nova, em um fluxo de 1,0 mL/min, é de aproximadamente 100 bar (1400 psi). Este valor de pressão pode aumentar com a idade da coluna ou com o uso. Uma vez que a separação cromatográfica seja satisfatória, variações da pressão da coluna são irrelevantes, desde que não excedam 200 bar (3000 psi). Para aumentar a vida útil da coluna, um pré-filtro em PEEK (artigo 15009 ou 15010) ou uma pré-coluna (artigo 18002 ou 18001) podem ser utilizados.

4.4 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC

4.4.1 Bomba e tubulações

O trabalho analítico, na faixa de sensibilidade necessária para esta análise, requer minuciosa limpeza da bomba e das tubulações do sistema de HPLC. Apenas reagentes e solventes com graus apropriados de pureza devem ser utilizados. Na detecção eletroquímica, mesmo os menores traços de substâncias eletroquimicamente ativas podem levar a um aumento substancial do ruído da linha de base ou acarretar o aparecimento de picos adicionais.

Na maioria dos casos, os problemas de detecção eletroquímica resultam de contaminações do sistema de HPLC. Sendo assim, como regra geral, recomenda-se o procedimento de peroxidação passiva do sistema de HPLC, com ácido nítrico, a cada 3 ou 4 meses, dependendo da intensidade da rotina de trabalho do equipamento.

Procedimento de peroxidação passiva:

Antes de dar início ao procedimento, é necessário desconectar a coluna e o detector eletroquímico do sistema de HPLC. Contudo, mantenha as tubulações de conexão da coluna e do detector, unindo-as com o auxílio de junções.

Primeiramente, remova qualquer resíduo de fase móvel do sistema, principalmente no caso de tampões, deixando circular água grau HPLC por aproximadamente 20 minutos com um fluxo de 1,5 mL/min. Em seguida, inicie o procedimento, bombeando uma solução aquosa de ácido nítrico 15 - 20%, com um fluxo de 1,5 mL/min, durante 20 minutos. A unidade de injeção deve ser submetida ao processo de injeção várias vezes. Se o injetor for do tipo manual, mude as posições *LOAD* e *INJECT* no mínimo dez vezes. Quando utilizar um amostrador automático, coloque um *vial* na bandeja de amostras, contendo a solução de ácido nítrico, e injete, repetidas vezes, o maior volume possível, como se fosse uma amostra sendo analisada.

Após a passivação o ácido nítrico é removido do sistema com água bidestilada, sendo necessário injetar várias vezes. Quando o valor do pH da água de lavagem estiver neutro o sistema pode voltar a ser equilibrado com a fase móvel.

4.4.2 Eletrodo de trabalho

O uso prolongado do detector eletroquímico pode resultar em contaminação da superfície ativa do eletrodo de trabalho, levando a um decréscimo em sensibilidade. Para restabelecer a sensibilidade do eletrodo, recomenda-se o seu tratamento com ácido cromosulfúrico.

Atenção: Use luvas adequadas e seja extremamente cuidadoso ao manipular soluções de ácidos concentrados. Tenha certeza de que o eletrodo esteja completamente seco antes de iniciar o procedimento de limpeza.

Procedimento: (Somente aplicável para os detectores eletroquímicos da Chromsystems)

1. Remova o eletrodo de trabalho da célula analítica. Tenha cuidado com o eletrodo, tocando apenas em suas extremidades.
2. Coloque o eletrodo sobre uma superfície plana.
3. Usando uma pipeta, deixe cair uma gota de ácido cromosulfúrico sobre a região central do eletrodo (ponto preto).
4. Aguarde de 2 - 5 minutos.
5. Lave o eletrodo com água bidestilada.
6. Recoloque o eletrodo de trabalho na célula analítica.
7. Re-equilibre o sistema cromatográfico.

4.4.3 Eletrodo de referência

(Somente aplicável para os detectores eletroquímicos da Chromsystems)

Com o tempo, os íons da solução eletrolítica (3 M 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 o eletrodo de referência com a solução 3 M KCl 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. A cristalização de sais dentro da célula pode causar rachaduras no diafragma, permitindo um vazamento do conteúdo interno do eletrodo de referência para a fase móvel em fluxo.

Em eletrodos de Ag/AgCl, que estejam sendo utilizados por longos períodos, cristais de cloreto de prata podem precipitar-se na forma de uma camada negra sobre o diafragma, provocando distúrbios no balanceamento do sistema de referência. Desta forma, o ajuste do potencial de trabalho não poderá ser mantido constante. Nesses casos, substitua o eletrodo ou tente limpar o diafragma com uma solução aquosa de amônia 25% (coloque o adaptador de Teflon em amônia 25% por uma noite e depois lave-o com bastante água).

4.4.4. 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, permitindo um fluxo contínuo da fase móvel, sem variações.

4.4.5. 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 de tempo 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 (50:50).

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 Preparo da amostra

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

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de urina

Normalmente a urina de 24h é utilizada para análise. Se não for possível, devem ser analisadas amostras frescas de urina. Os dados, nesse caso, devem ser levados em conta para a creatinina urinária. A urina de 24h deve ser coletada em um recipiente apropriado contendo 10 ml de HCl à 25%. Deste modo, a urina é estável por pelo menos 5 dias mantidas em temperaturas entre +2° e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento da urina de 24h, preparar alíquotas e congelar abaixo de -18°C.

5.2 Reconstituição do padrão de calibração em urina

O padrão de calibração (artigo 2009) é rastreável à substâncias de referência obtidas de fornecedores certificados. Após reconstituição, o padrão de calibração deverá ser preparado de acordo com o procedimento de preparação das amostras, como se fosse uma amostra de paciente. Desta forma, o padrão deverá ser usado para calibrar o sistema de HPLC. **Para reconstituir o padrão de calibração em urina liofilizado, transferir exatamente 5,0 ml de água destilada para o frasco contendo o padrão.** Deixar o frasco em repouso, em temperatura ambiente, por cerca de 10 - 15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar o frasco ocasionalmente. Evite a exposição direta à luz. O valor de concentração do padrão depende do lote e poderá ser encontrado no folheto de informações que acompanha o padrão.

Atenção:

Este produto foi fabricado a partir de pool de urina humana testado. Cada doador é constantemente sujeito a controle médico e considerado livre de doenças infecciosas. Como não existem métodos que deem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do padrão reconstituído:

O padrão reconstituído é estável por até 5 dias, mantido fechado e protegido da luz, em temperaturas entre +2 e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até 3 meses) alíquotar e armazenar abaixo de -18°C.

5.3 Reconstituição dos controles

Depois de reconstituídos, os controles em urina nível normal (artigo 0040) e nível patológico (artigo 0050) devem ser analisados como se fossem amostras de pacientes, seguindo o mesmo procedimento analítico designado para a preparação das amostras. Os controles preparados devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Para reconstituir os controles liofilizados, transferir exatamente 8,0 ml de água destilada para cada frasco.

Deixar o frasco em repouso, à temperatura ambiente, por 10 a 15 minutos. Evitar a exposição direta à luz. Agitar o frasco ocasionalmente, até que seja formada uma mistura homogênea.

O valor da concentração depende do lote e do nível de cada controle e poderá ser encontrado em folhetos à parte, que acompanham a embalagem dos controles.

Atenção:

Este produto foi fabricado a partir de pool de urina humana testado. Cada doador é constantemente sujeito a controle médico e considerado livre de doenças infecciosas. Como não existem métodos que dêem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade dos controles reconstituídos:

Os controles reconstituídos são estáveis por até 5 dias, mantidos fechados e protegidos da luz, em temperaturas entre +2 e +8°C. Caso os controles não sejam utilizados dentro deste período, devem ser aliquotados e armazenados abaixo de -18°C, por um período máximo de 3 meses.

5.4 Hidrólise ácida das amostras de urina

Adicionar 100 µl do Padrão Interno a 1 ml de urina em um tubo de hidrólise e ajustar o pH em 0,8-1,0 utilizando HCl 2 N. Incubar o tubo fechado por 30 min. à 90-100°C em banho-maria. Resfriar à temperatura ambiente imediatamente.

5.5 Extração da amostra**Neutralização**

Adicionar 6 ml do Tampão de Neutralização na urina hidrolisada; ocorrerá uma mudança de cor de amarelo para roxo (isso indica que o pH está ajustado corretamente para a etapa de extração).

Se as amostras não ficarem roxas indica que elas foram fortemente acidificadas na etapa de hidrólise. Nesse caso, adicionar NaOH 2N gota por gota até a mudança de cor para o roxo ocorrer.

Extração:

1. Agitar brevemente (ressuspender) e rotular uma coluna de preparação para cada amostra. Remover a tampa da coluna, então quebrar a ponta do fecho. Eliminar por completo o tampão de equilíbrio.
2. Aplicar toda a amostra de urina neutralizada na coluna e descartar o eluato.
3. Lavar a coluna de preparação como se segue, movendo o mínimo possível a camada de resina:
 - a. 10 ml de água ultrapura (grau HPLC)
 - b. 5 ml de tampão de lavagem
4. Descartar cada eluato.

Eluição:

1. Colocar a coluna de preparação em um tubo rotulado, adicionar 5 ml do Tampão de Eluição, coletar o eluato e misturar cada eluato brevemente.
2. Injetar 20 µl do eluato acidificado (30 µl de ácido acético glacial/ml ou 150 µl no eluato completo) no sistema HPLC.

5.6 Procedimento de preparo da amostra**Hidrólise ácida**

1. Para 1 ml de urina, adicionar 100 µl do Padrão Interno e ajuste o pH para 0,8-1,0 usando HCl 2N.
2. Incubar em um tubo de hidrólise à 90-100°C por 30 min.
3. Então resfriar imediatamente.

Neutralização

Adicionar 6 ml de Tampão de Neutralização à urina hidrolizada.

Uma alteração de cor e amarelo para o roxo deve ocorrer neste momento!

Se a amostra permanecer amarela, adicionar NaOH 2N gota a gota até que a mudança de cor ocorra.

Extração

1. Aplicar toda a amostra de urina neutralizada na coluna
2. Descartar o eluato.
3. Lavar subseqüentemente com 10 ml de água ultrapura (grau HPLC), e então com 5 ml de Tampão de Lavagem
4. Descartar o eluato.

Eluição

1. Aplicar 5 ml do Tampão de Eluição na coluna de preparação e coletar o eluato.
2. Misturar cada eluato brevemente.

Análise

1. Acidificar o eluato com 150 µl de ácido acético glacial (30 µl/ml de eluato),
2. Injetar 20 µl do eluato acidificado no sistema HPLC.

5.7 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas são estáveis antes da acidificação com ácido acético glacial (pH>7) por 3 dias em temperatura ambiente e por 1 semana em +2 a +8°C, e após a acidificação por 1 dia em temperatura ambiente e por no máximo 7 dias em +2 a +8°C. Amostras armazenadas a -18°C, antes ou depois da acidificação, são estáveis por pelo menos 4 semanas.

6 Resultados e avaliação**6.1 Calibração dos dados do sistema de análise**

Antes de iniciar a análise quantitativa das amostras dos pacientes, é recomendável que um cromatograma de calibração, contendo todas as substâncias de interesse, seja obtido. Para esse propósito, o padrão de calibração deve ser injetado repetidamente no sistema, até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção, resolução e área/altura de picos praticamente idênticos. Esse cromatograma pode ser usado para ajustar os parâmetros de integração corretamente. O cromatograma do último teste de injeção pode ser usado para calibrar o sistema de avaliação (Software PC ou integrador).

Entrar com os dados dos tempos de retenção obtidos e as concentrações do padrão na tabela de avaliação:

Para quantificação exata de 3-MT, usado no diagnóstico de paragangliomas [7], o calibrador em urina (artigo 2009) deve ser usado. O padrão de calibração aquoso (artigo 2023) pode ser usado somente para avaliação semi-quantitativa.

Utilizando padrão de calibração aquoso (artigo 2023):

Analito	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/l)	Concentração (nmol/l)
Normetanefrina	5.5	250	1365
Metanefrina	7.0	250	1268
Padrão Interno (HMBA)	8.4	1	1
3-Metoxitiramina	12.5	250-350	1495-2093

Este calibrador é injetado diretamente no sistema de HPLC (sem preparação de amostra).

Utilizando o padrão de calibração em urina (artigo 2009):

Analito	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/L ou nmol/L)
Normetanefrina	5.5	Ver folheto de informação
Metanefrina	7.0	Ver folheto de informação
Padrão Interno (HMBA)	8.4	1
3-Metoxitiramina	12.5	Ver folheto de informação

O padrão de calibração liofilizado em urina deverá ser preparado de acordo com o procedimento de preparação das amostras, como se fosse uma amostra de paciente. Desta forma, o padrão deverá ser usado para calibrar o sistema de HPLC. Para garantir que nem o calibrador nem as condições do HPLC (tempo de retenção, etc) tenham mudado durante a análise, o padrão preparado deve ser injetado durante a análise e novamente no final. O valor de concentração do padrão depende do lote e poderá ser encontrado no folheto de informações que acompanha o padrão.

6.2 Quantificação com Padrão Interno

O uso de um padrão interno permite que perdas potenciais durante o preparo da amostra sejam compensadas. Uma quantidade conhecida de padrão interno é adicionada em cada amostra (padrão de calibração, controles, amostra de paciente). O PC ou integrador é dado o pico apropriado (na análise de catecolaminas, o padrão interno será o pico nº 3 no cromatograma do padrão de calibração) da corrida de calibração como o padrão interno.

Composição do padrão de calibração aquoso (artigo 2023):

Normetanefrina:	50 µg/l	(273 nmol/l)
Metanefrina:	50 µg/l	(254 nmol/l)
3-Metanefrina:	50-70 µg/l	(299-419 nmol/l)
Padrão Interno (HMBA):	100 µg/l	

O procedimento de preparação da amostra é feito em uma diluição de 5:1 (1 ml de urina em 5 ml de eluato), portanto os valores do padrão de calibração correspondem ao respectivo valor multiplicado por 5.

Normetanefrina:	250 µg/l	(1365 nmol/l)
Metanefrina:	250 µg/l	(1268 nmol/l)
3-metoxitiramina (HMBA):	250-350 µg/l	(1495-2093 nmol/l)
Padrão Interno:	500 µg/l	

Concentração do padrão interno:

4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (HMBA) 5,0 ng/µl.

São adicionados 100 µl de solução padrão interno (5,0 ng/µl) em 1 ml de urina.

A concentração final de padrão interno na amostra é, portanto de 500 ng/ml (500 µg/l). Uma vez que esta concentração é idêntica à concentração presente no padrão de calibração, a concentração do padrão interno em todas as amostras deverá ser considerada como "1".

Quando for utilizado o padrão de calibração liofilizado em urina (artigo 2009) desde que a mesma quantidade de padrão interno seja adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes, a concentração do padrão interno também poderá ser considerada como "1".

Os padrões de calibração e o padrão interno são rastreáveis a substâncias de referência e certificados.

Cálculo dos valores da creatinina referida (em µg/g de creatinina):

Dividir o valor da concentração (em µg/l) pela concentração da creatinina na urina (em g/l).

Cálculo da excreção em 24h (em µg):

Multiplicar a concentração determinada (em µg/l) pelo volume de urina (em l).

7 Controle de Qualidade

Os controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema (controles Chromsystems artigos 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.

8 Valores de referência

Os níveis de referência dependem da técnica de análise empregada e da população examinada. Geralmente em pacientes hipertensos é observada uma maior excreção de metanefrinas do que em indivíduos saudáveis. No Instituto de Química Clínica do Hospital da Universidade de Monique, o prof. Jacob analisou amostras de pacientes (urinas de 24h) por HPLC durante muitos anos e encontrou os seguintes valores de referência:

Normetanefrina: até 800 µg/24h (até 4.4 µmol/24h)
Metanefrina: até 400 µg/24h (até 2.0 µmol/24h)

No âmbito deste estudo, 100 pacientes com feocromocitoma puderam ser identificados, e o diagnóstico foi confirmado histologicamente depois de ser sugerido.

Se indivíduos saudáveis são considerados como população de referência, valores mais baixos serão obtidos. (L. Thomas, Labor und Diagnose, 6. Aufl., TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2005):

Normetanefrina: até 390 µg/24h (até 1.95 µmol/24h)*
Metanefrina: até 320 µg /24h (até 1.52 µmol/24h)*

*na literatura citada há um erro no fator de conversão, deverá ser lido:

Normetanefrina: até 2.13 µmol/24h
Metanefrina: até 1.62 µmol/24h

Esses valores foram determinados com métodos analíticos diferentes (HPLC, RIA, TLC).

9 Fatores de conversão

A tabela seguinte lista os fatores de conversão entre massa e concentrações molares.

Analito	µg/l para nmol/l	nmol/l para µg/l
Normetanefrina	x 5.4585	x 0.1832
Metanefrina	x 5.0710	x 0.1972
3-Metoxitiramina	x 5.9809	x 0.1672

10 Armazenamento e estabilidade dos reagentes

Reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de estocagem indicados no rótulo sejam obedecidas.

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	Temperatura ambiente
Padrão de Calibração	+2 a +8° C
Padrão de Calibração em Urina	Abaixo de -18° C
Padrão Interno	+2 a +8° C
Tampão de Neutralização	Temperatura ambiente
Tampão de Lavagem	Temperatura ambiente
Tampão de Eluição	Temperatura ambiente
Colunas de limpeza de amostra	Temperatura ambiente
Controles em urina nível I e II	+2 a +8 °C

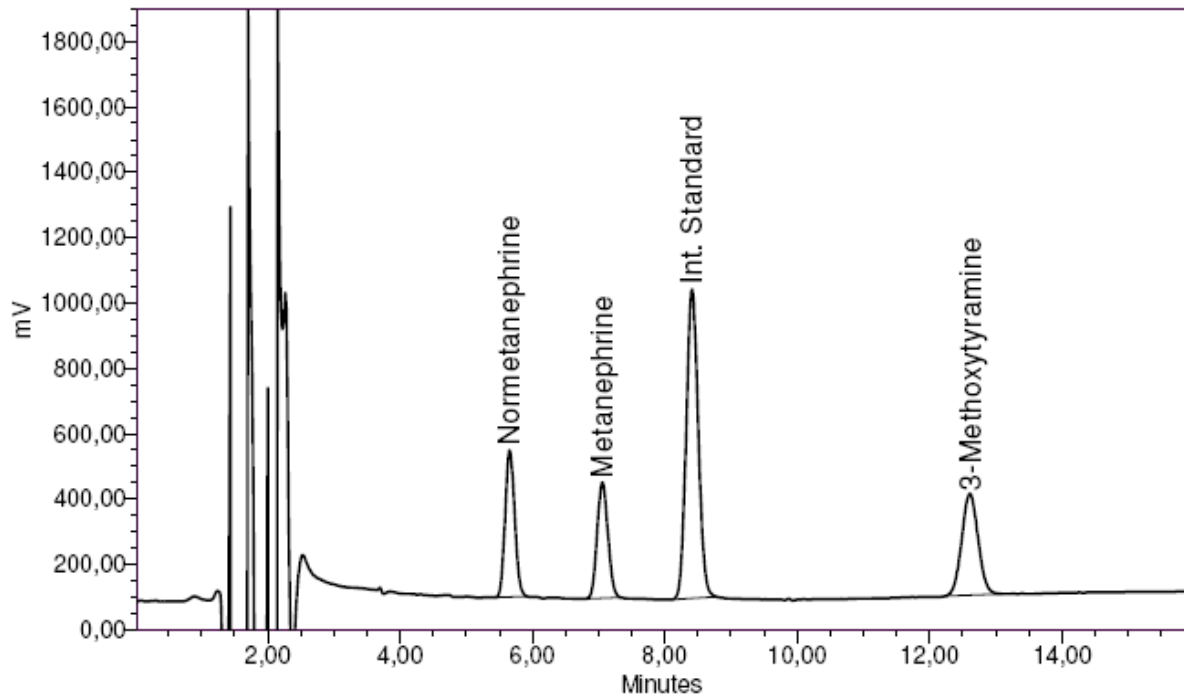
Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido estabelecido anteriormente, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles,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

11 Descarte de resíduos

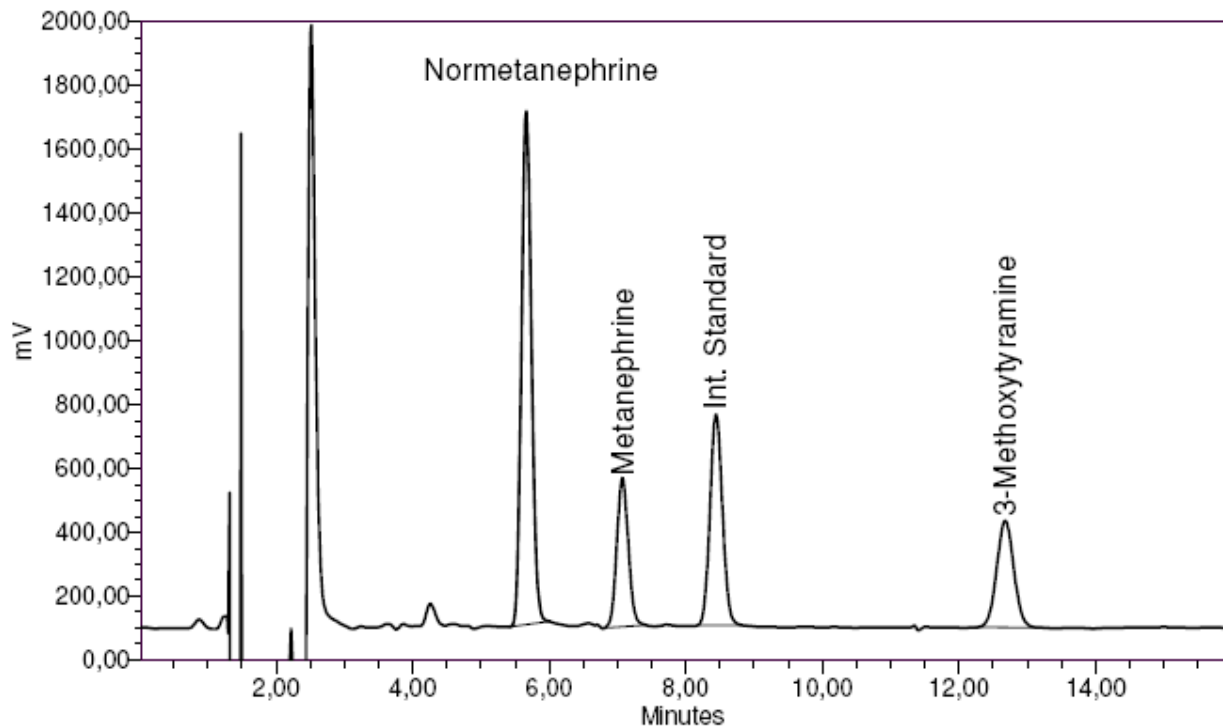
A fase móvel contém **solventes orgânicos** e deve ser descartada como resíduo **livre de halogênios**, de acordo com as diretrizes locais e legislação vigente.

12 Exemplos de cromatogramas

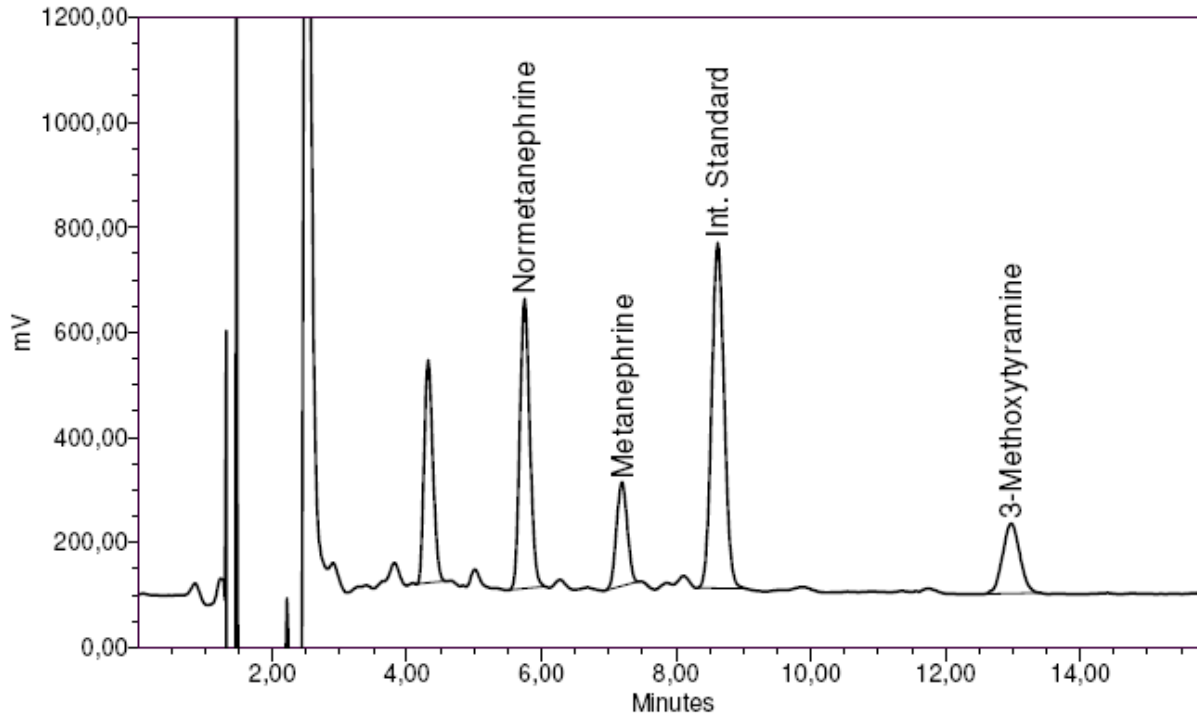
12.1 Cromatograma de um padrão de calibração aquoso



12.2 Cromatograma de um controle de urina (nível patológico)



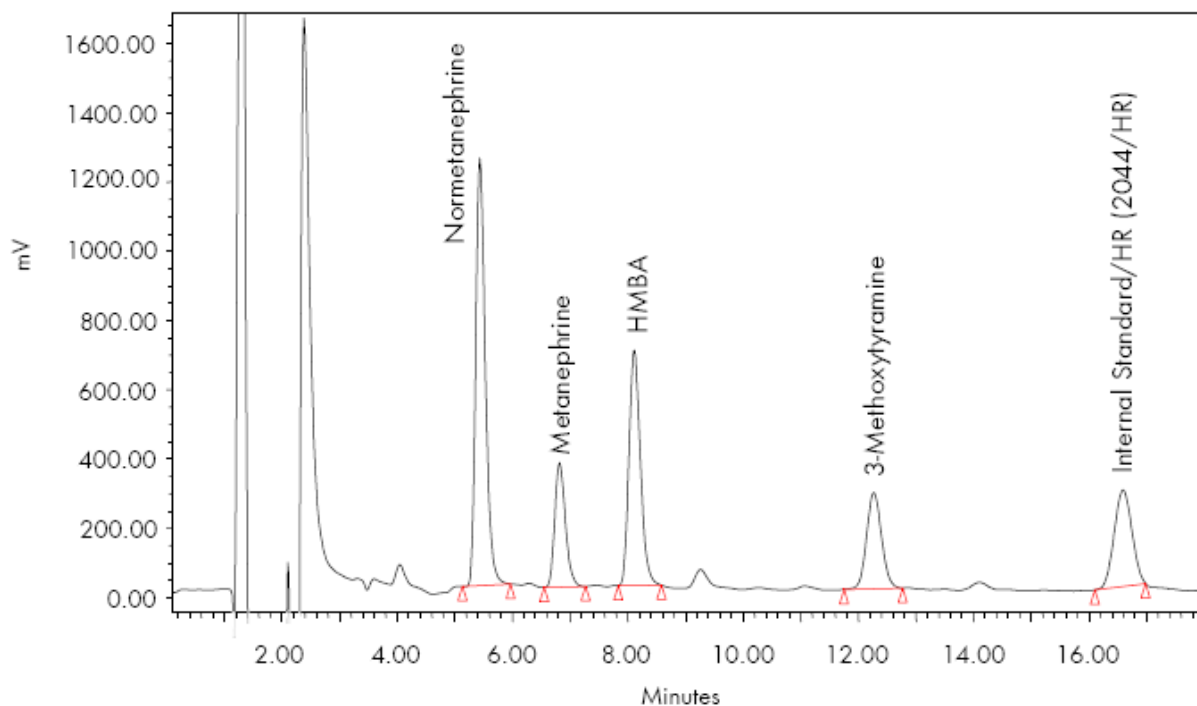
12.3 Cromatograma de uma amostra de paciente



Normetanefrina: 370 µg/l (2020 nmol/l)
 Metanefrina: 160 µg/l (811 nmol/l)
 3-Metoxitiramina: 180 µg/l (1077 nmol/l)

12.4 Cromatograma de um paciente com padrão interno alternativo (artigo 2024/HR)

Quando houver interferência por alimentos contendo capsaicina a determinação deve ser feita com o padrão interno alternativo (Padrão Interno/HR). Ver no cap. 16.



13 Interferentes conhecidos

O 4-hidroxi-3-metoxi-benzilamina (HMBA), usado como padrão interno, é uma substância de ocorrência natural. Normalmente sua concentração na urina não é detectável e, portanto, não influencia a análise.

A capsaicina, um ácido graxo do HMBA, causa a sensação de calor da pimenta. É também um ingrediente do curry. Dependendo dos hábitos nutricionais a concentração na urina do HMBA pode estar aumentada em quantidades detectáveis então o padrão interno é quantificado falsamente alto com resultados subestimados de normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina.

Neste caso é recomendado o uso do padrão interno alternativo (padrão interno/HR, artigo 2044/HR). A preparação da amostra e a análise em HPLC permanecem o mesmo, mas o tempo de corrida é estendido para aproximadamente 18 minutos.

14 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
Ruídos de linha de base	Bolhas de ar na bomba	Desgaseificar o Sistema de HPLC (purgar)
	Sistema não está equilibrado	Recircular a fase móvel por um período maior
Corrente de fundo elevada	Alteração de temperatura ambiente	Usar forno para coluna
	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

	Pequeno vazamento de uma das conexões do sistema	Aperte ou substitua os pilares conectores
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
Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura ambiente	Usar forno para coluna
	Fluxo irregular	Checar o fluxo. Se o fluxo da bomba estiver irregular, conferir se há bolhas de ar no sistema; acionar a assistência técnica se necessário.
	Sistema ainda não está em equilíbrio	
Picos duplos	Volume morto na entrada da coluna	Substituir a coluna
	Rachaduras na coluna	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 inapropriado 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	Checar o acoplamento dos capilares para correto assentamento
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 bloqueado	Lavar o sistema de injeção com água, seguido de isopropanol e novamente com água

15 Literatura

1. Lenz T, Gossman J, Schulte K-L, Salewski L, Geiger H. (2002) Diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Lab* **48**(1-2): 5-18.
2. Wisser H, Bertsch T. Katecholamine und Katecholaminmetabolite, in: Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 6. Aufl, 1425-40, TH-Books Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main (2005).
3. Hernandez FC, Sanchez M, Alvarez A, Díaz J, Pascual R, Pérez M, Tovar I, Martínez P. (2000) A five-year report on experience on the detection of pheochromocytoma. *Clin Biochem* **33**(8): 649-55.
4. Gerlo EA, Sevens C. (1994) Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: Diagnostic value in 19 cases. *Clin Chem* **40**(2): 250-6.
5. Héron E, Chatellier G, Billaud E, Foos E, Plouin P-F. (1996) The urinary metanephrine-to-creatinine ratio for the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* **125**(4): 300-3.
6. Witteles RM, Kaplan EL, Roizen MF. (2000) Sensitivity of diagnostic and localization tests for pheochromocytoma in clinical practice. *Arch Intern Med* **160**(16):2521-4.
7. Van Duinen N, Steenvoorden D, Kema IP, Janssen JC, Vriends AH, Bayley JP, Smit JW, Romijn JA, Corssmit EP. (2010) Increased urinary excretion of 3-methoxytyramine in patients with head and neck paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(1): 209-14.

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	1-53
Vials vazios	Estante de amostras	55-107 (mesmos números das amostras)
Ácido acético glacial	Estante de amostras	108
Tampão de neutralização (2025/A)	Estante de solventes	109
Tampão de Lavagem (2026/A)	Estante de solventes	110
Tampão de Eluição (2027/A)	Estante de solventes	111
Colunas de preparo de amostras (2028/A)	Estantes DEC	113-220
Vials de coleta	Estante de coleta	Mesmos números dos cartuchos SPE
Água destilada	Reservatório	

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
Padrão Interno (2024/A)	50 µl
Tampão de Neutralização (2025/A)	3.15 ml
Tampão de Lavagem (2026/A)	1.2 ml
Tampão de Eluição (2027/A)	2.2 ml
Ácido acético glacial	40 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.

Hidrólise ácida das amostras de Urina

Adicione 50µl do padrão interno a 500 µl de urina em um frasco de vidro (10 x 75 mm, adequados para a estante 28 do ASPEC™) e ajuste o pH para 0.8-1.0 cuidadosamente usando 2 N HCl.

Como regra geral use 40 µl 2 N HCl para 500 µl de urina!

Cubra os frascos com papel alumínio e incube por 30 minutos em 90-100°C em banho-maria. Resfrie os frascos, remova o papel alumínio e os coloque na estante do ASPEC™. Alternativamente, tubos com tampas de rosca podem ser usadas para hidrólise.

Princípio dos arquivos de trabalho do ASPEC™

O ASPEC™ transfere 330µl de cada espécimen de urina hidrolisada para um novo frasco vazio, e adiciona tampão de neutralização para diluição e tamponamento de pH. **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:

“META_NI”:

ASPEC™ executa somente o preparo de amostras; as amostras não são injetadas no sistema de HPLC!

“META_NI”:

ASPEC™ devem ser adequadamente conectados ao sistema de HPLC! Este arquivo controla o preparo de amostras completo para metanefrinas 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 40 µl; e pode ser alterado na etapa #16 – INJECT.

A etapa #19- 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.

Verificação do ajuste de pH automático

Para verificar o ajuste correto do pH, uma pequena alíquota (aprox. 10%) de urina neutralizada é deixada no frasco de mistura após o preparo de amostras.

- A cor de azul a roxa indica que o ajuste de pH foi correto.
- Amostras coloridas em amarelo-marrom foram fortemente acidificadas no processo de hidrólise. Estas amostras devem ser diluídas com água destilada (ou o valor de pH da urina deve ser aumentado manualmente) e reanalisadas.

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 2021/2022) 	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Usar óculos e luvas de proteção. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.
Padrão de Calibração (artigo 2036) 	Perigo H290 Pode ser corrosivo a metais.
Padrão Interno (artigo 2024, 2024/A1) 	Perigo H290 Pode ser corrosivo a metais.
Mix de Interferência (artigo 2099) 	Perigo H290 Pode ser corrosivo a metais.
Tampão de Lavagem (artigo 2026, 2026/A1, 2026/A5) 	Perigo H315 Irritante à pele. H319 Irritante aos olhos. 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. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água.
Tampão de Eluição (artigo 2027) 	Perigo H290 Pode ser corrosivo a metais. H315 Causa irritação na pele. H319 Causa irritação séria aos olhos. 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. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave

abundantemente com sabão e água.

Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:

Padrão de calibração em urina (artigo 2009, 2009/T)

Padrão interno/alta resolução (artigo 2044/HR)

Tampão de neutralização (artigo 2025, 2025/A1, 2025/A5)

Controles endócrinos em urina (artigo 0040, 0050)

Apêndice III: Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

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

Área ou altura do pico da substância A no cromatograma do padrão de calibração = $A_{\text{Padrão}}$

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 padrão de calibração = $IS_{\text{Padrão}}$

A concentração C da substância A no padrão de calibração = $C_{\text{Padrão}}$

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

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

Apêndice IV: Validação

Para conferir a linearidade e a validação do método, as amostras de urina foram enriquecidas com quantidades definidas de metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina. Múltiplas alíquotas dessa mistura foram submetidas ao procedimento de preparação da amostra.

Linearidade/limite de quantificação

O método é linear a partir do limite inferior de quantificação até a concentração indicada.

Analito	Limite de quantificação [µg/l] aprox.*	Faixa linear até pelo menos [µg/l]
Normetanefrina	5	2500
Metanefrina	11	5000
3-Metoxitiramina	10	5000

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

Em altas concentrações um volume menor de injeção (10µl) devem ser escolhidos para se evitar sobrecarga do detector.

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir do slope da curva de calibração das amostras de urina e soluções de padrões diluídos.:

Normetanefrina	94%
Metanefrina	97%
3-Metoxitiramina	95%
Padrão Interno (HMBA)	96%

Amostras de urina com alta quantidade de sal e que foram muito acidificadas da etapa de hidrólise podem exibir baixas taxas de recuperação (aprox. 75%). No cálculo, essas perdas são compensadas pela inclusão do padrão interno.

Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n=10) da mesma amostra e determinação dos analitos em três concentrações diferentes:

Analito	CV em % n = 10 (concentração em µg/l)		
	n=10	n=10	n=10
Normetanefrina	1.4 (325)	0.8 (968)	1.0 (708)
Metanefrina	1.0 (189)	0.9 (362)	2.7 (275)
3-Metoxitiramina	2.1 (164)	0.9 (357)	1.8 (264)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos e da determinação das concentrações de normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina em pool de urina (níveis normal e patológico) em 10 séries diferentes de testes.

Analito	CV em % (concentração em µg/l)	
	n=100	n=100
Normetanefrina	2.7 (351)	1.7 (1427)
Metanefrina	2.4 (170)	2.6 (1206)
3-Metoxitiramina	4.4 (153)	3.5 (1276)

Apêndice V: Declaração de Conformidade

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

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
D-82166 Gräfelfing, Germany

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

Nomenclature term: Other Toxicology
Nomenclature code: 12-09-02-90-00
Classification: other product

Product name: **Metanephrines in Urine**
Controls: **Endocrine Urine Control**


meets 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 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN ISO 18113-2, EN 980,
EN ISO 23640, EN 13641

Notified body: -

Munich, June 04, 2012


Michael Meier
Managing Director


Vers. 2.1

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

Telefax: +49 89 18930-8
Telefax: +49 89 18930-199

me@chromsystems.de
www.chromsystems.de

 Zertifiziert nach: DIN EN ISO 9001,
DIN EN ISO 13485, ISO 13485 QMBR