

BIOGENE AMINE  
BIOGENIC AMINES  
AMINES BIOGÈNES  
AMMINE BIOGENE  
AMINAS BIÓGENAS



Manual de Instruções para Análise por HPLC  
Catecolaminas  
em Plasma

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 5000

CATECOLAMINAS EM PLASMA POR HPLC  
CATECHOLAMINES IN PLASMA HPLC  
ANVISA 10350840141

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.

**Regularizado por: BioSys Ltda.**

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Niterói, RJ  
CEP: 24020-112  
[sac@biosys.com.br](mailto:sac@biosys.com.br)

SAC: (21) 3907 2534  
CNPJ: 02.220.795/0001-79  
[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)

**Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH**

Am Haag 12  
82166 Gräfelfing  
Alemanha

Fone: +49 89 18930-0  
Fax: +49 89 18930-199  
[www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com)

# 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.....	7
3.3 Otimização do potencial de trabalho.....	8
4 Sistema de HPLC .....	9
4.1 Parâmetros de equipamentos e instrumentos .....	9
4.2 Coluna cromatográfica .....	10
4.3 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC .....	10
4.3.1 Bomba e tubulações .....	10
4.3.2 Eletrodo de trabalho (Ativação).....	11
4.4.3 Eletrodo de referência.....	11
4.3.4 Evitando flutuações de fluxo da bomba.....	11
4.4.5 Desligando o equipamento.....	12
5 Separação cromatográfica .....	12
6 Preparo da amostra.....	12
6.1 Coleta e armazenamento de amostras de plasma .....	12
6.2 Reconstituição do padrão de calibração em plasma .....	13
6.3 Reconstituição dos controles .....	14
6.4 Procedimento de preparo das amostras.....	14
6.5 Prazo de validade das amostras .....	15
7 Resultados e avaliação .....	15
7.1 Calibração do sistema .....	15
7.2 Quantificação com Padrão Interno .....	16
8 Controle de Qualidade.....	17
9 Valores de referência .....	17
10 Fatores de conversão.....	17
11 Armazenamento e validade dos reagentes .....	18
12 Descarte de resíduos .....	18
13 Exemplos de cromatogramas .....	19
13.1 Cromatograma de um calibrador em plasma.....	19
13.2 Cromatograma de um controle em plasma (nível patológico) .....	19
14 Problemas e Soluções .....	20
15 Literatura.....	23
Apêndice I: Informações de segurança.....	25
Apêndice II: Cálculo manual .....	26
Apêndice III: Validação.....	27
Apêndice IV: Declaração de Conformidade .....	28
Apêndice V: Símbolos .....	29

# 1 Informações gerais

Nº do artigo	Produto	
5000	Kit de reagentes para análise por HPLC de Catecolaminas em plasma. Para 200 análises.	
	<b>Componentes do Kit:</b>	
	Fase móvel	1000 ml
	Padrão de calibração	10 ml
	Padrão Interno	10 ml
	Solução tampão de extração	100 ml
	Solução tampão de limpeza	2 x 300 ml
	Solução tampão de eluição	25 ml
	Colunas de preparo de amostras	4x50unidades
	<b>Componentes disponíveis separadamente:</b>	
5001	Fase móvel	1000 ml
5002	Fase móvel	10 x 1000 ml
5003	Padrão de calibração	10 ml
5009	Padrão de calibração liofilizado em plasma	10 x 2,5 ml
5004	Padrão Interno	10 ml
5011	Solução tampão de extração	100 ml
5005	Solução tampão de limpeza	300 ml
5006	Solução tampão de eluição	25 ml
5007	Colunas de preparo de amostras	50 unidades
	<b>Acessórios</b>	
5100	Coluna para HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
5007/Vi	Vials de plástico para colunas de preparo de amostras	50 unidades
	<b>Controles</b>	
5003	Padrão de Calibração	10 ml
5009	Padrão de Calibração em plasma (lioф.)	10 x 2,5 ml
0010	Controle endócrino em plasma, nível normal (lioф.)	10 x 5 ml
0020	Controle endócrino em plasma, nível patológico (lioф.)	10 x 5 ml
	<b>Acessórios especiais para análise de L-DOPA, DHPG e DOPAC</b>	
5031	Fase móvel	1000 ml
5130	Coluna para HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
	<b>Acessórios para detectores eletroquímicos da Chromsystems</b>	
41203	Eletrodo de trabalho, ativado e testado	1 peça
41211	Eletrodo de referência Ag/AgCl	1 peça
41239	Solução de KCl, 3 mol/L	50 ml

## 2 Introdução

As catecolaminas adrenalina, noradrenalina e dopamina são sintetizadas a partir dos aminoácidos L-fenilalanina e L-3,4-dihidroxifenilalanina e desempenham papel fundamental no organismo como hormônios e neurotransmissores (Figura 1).

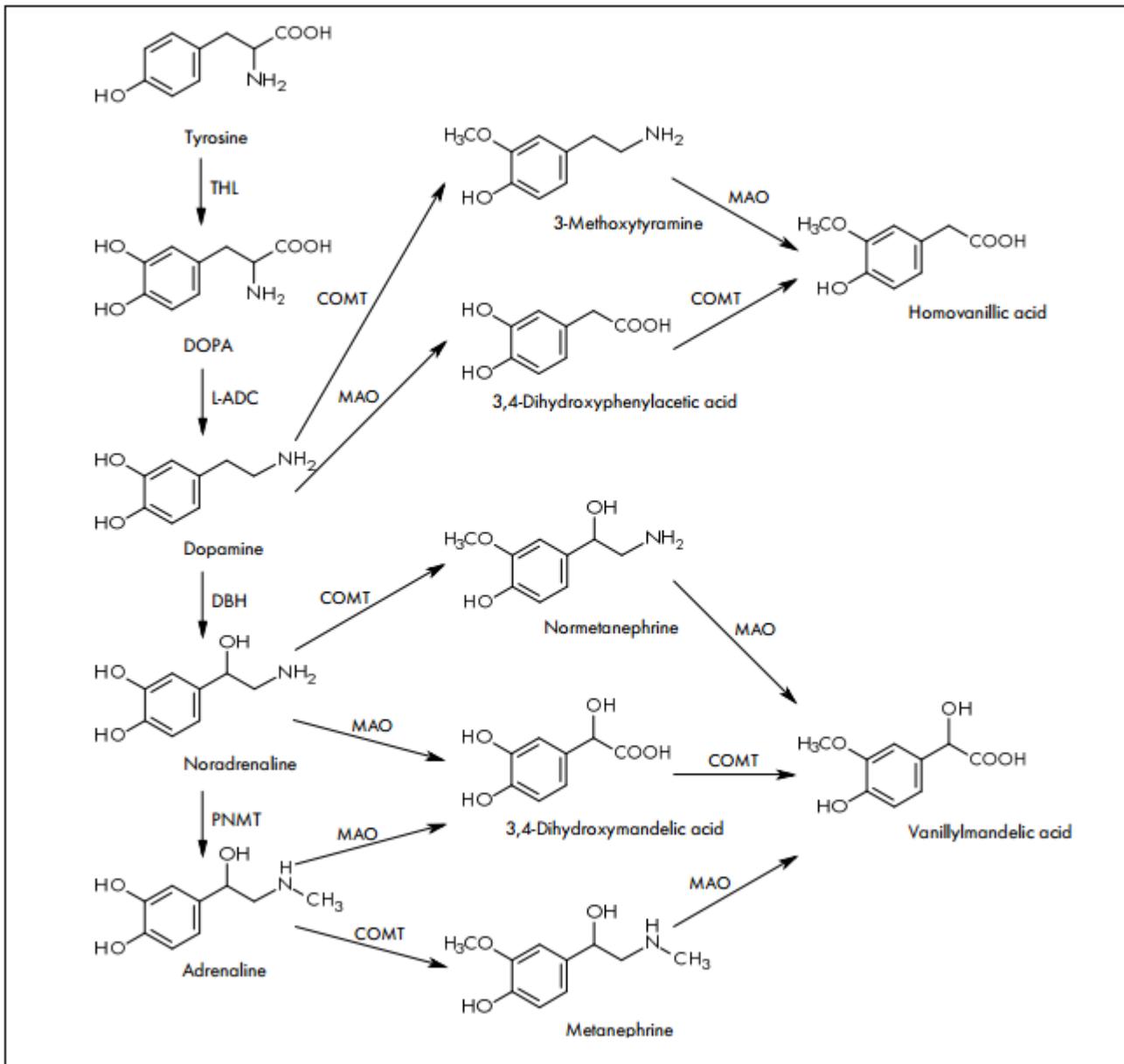


Figura 1 – Metabolismo das Catecolaminas e Metanefrinas

A determinação dos níveis de catecolaminas no plasma, urina e tecidos é de importância clínica no diagnóstico de feocromocitoma e alguns outros tumores do sistema nervoso (2-5). Essas doenças são caracterizadas por um grande aumento na produção de catecolaminas no tecido correspondente, resultando num aumento da circulação e excreção de catecolaminas na urina. As concentrações plasmáticas e urinárias de catecolaminas e seus metabólitos atingem níveis muito acima dos valores de referência (6). Exames da secreção de catecolaminas em tumores são preferencialmente realizados através da determinação quantitativa de catecolaminas em amostras de urina de 24h. Para exames de localização de tumores e de testes farmacológicos funcionais é necessária a determinação de catecolaminas no plasma (3-7).

A determinação quantitativa das catecolaminas plasmáticas e urinárias não é somente útil no diagnóstico diferencial de hipertensão, mas também na avaliação de outros aspectos clínicos e farmacológicos. As concentrações de noradrenalina e adrenalina são indicativas da atividade do sistema nervoso simpático (8-9) e são parâmetros importantes na insuficiência cardíaca congestiva, doenças coronarianas, *diabetes mellitus*, arteriosclerose, asma aguda e outros (10-18). Os níveis de catecolaminas também fornecem informações úteis em questões científicas nas pesquisas sobre estresse e na medicina esportiva (19-22).

### **Uso específico:**

O kit de reagentes de catecolaminas no plasma da Chromsystems é uma ferramenta de diagnóstico in vitro para ser utilizada em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa de adrenalina, noradrenalina e dopamina em amostras de plasma de pacientes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica. Ele é utilizado para testes de monitoramento de pacientes com suspeita de tumores secretores de catecolaminas.

### **Princípio do kit de reagentes:**

O rápido desenvolvimento das técnicas de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica tem oferecido um rápido e confiável método para análise de catecolaminas. Com este Kit de reagentes da Chromsystems®, as catecolaminas são extraídas da amostra através da adsorção em colunas de preparo, antes da análise em HPLC. O preparo da amostra é simples, tendo em vista que nenhum ajuste de pH do plasma se faz necessário. Além disso, o procedimento de preparação inclui apenas etapas de limpeza com soluções do tipo tampão. Uma coluna cromatográfica seletiva, em combinação com uma fase móvel otimizada para esta separação, permite uma precisa e exata quantificação das catecolaminas plasmáticas. Com este Kit de reagentes da Chromsystems®, um analista pode realizar o exame de até 100 amostras de plasma por dia, obtendo resultados rápidos e confiáveis.

## **3 Teoria da detecção eletroquímica**

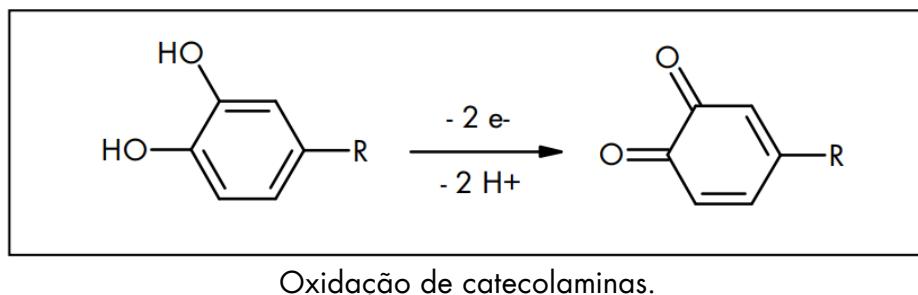
### **3.1 Princípios gerais**

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 contra-eletrodo.

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 contra-eletrodo 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.

Na detecção das catecolaminas considere:



### 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 3.

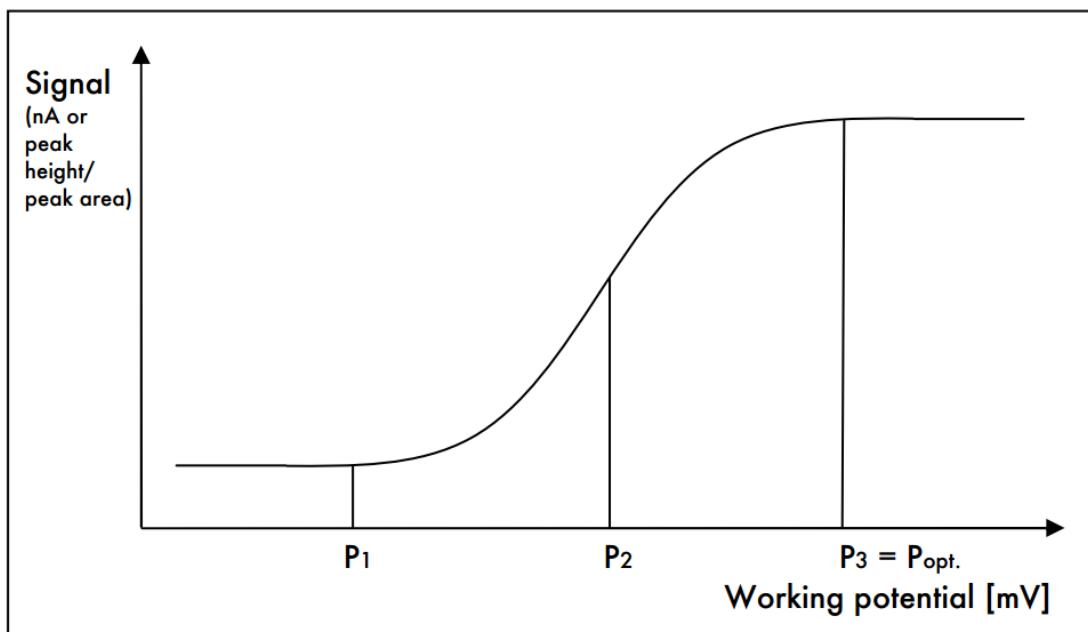


Figura 3 – Correlação entre potencial de trabalho e detector de sinal.

Analizando o gráfico anterior, pode-se observar que em um potencial igual ou menor do que  $P_1$  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  $P_2$ , 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 podem ser transformadas eletroquimicamente.

### 3.3 Otimização do potencial de trabalho

Experiências têm demonstrado que a curva de potencial de trabalho versus sinal cromatográfico (ver Figura 2) 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 catecolaminas, avalia-se a área ou a altura do pico do padrão interno dihidroxibenzilamina (DHBA) em solução aquosa padrão (n° 5003), uma vez que sua transformação eletroquímica requer o maior potencial de trabalho. Para tanto, o seguinte procedimento é recomendado (ver Figura 4):

1. Ajuste o potencial de trabalho em +360mV e injete o padrão de calibração (n° 5003) Determine a área ou a altura do pico de DHBA no cromatograma obtido.
2. Aumente o potencial de trabalho em 40mV. Injete novamente o padrão de calibração (n° 5003) e determine a área ou a altura do pico de DHBA.
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.

O potencial de trabalho obtido por este método geralmente encontra-se entre +400mV e +500mV (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 cloreto de potássio 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.

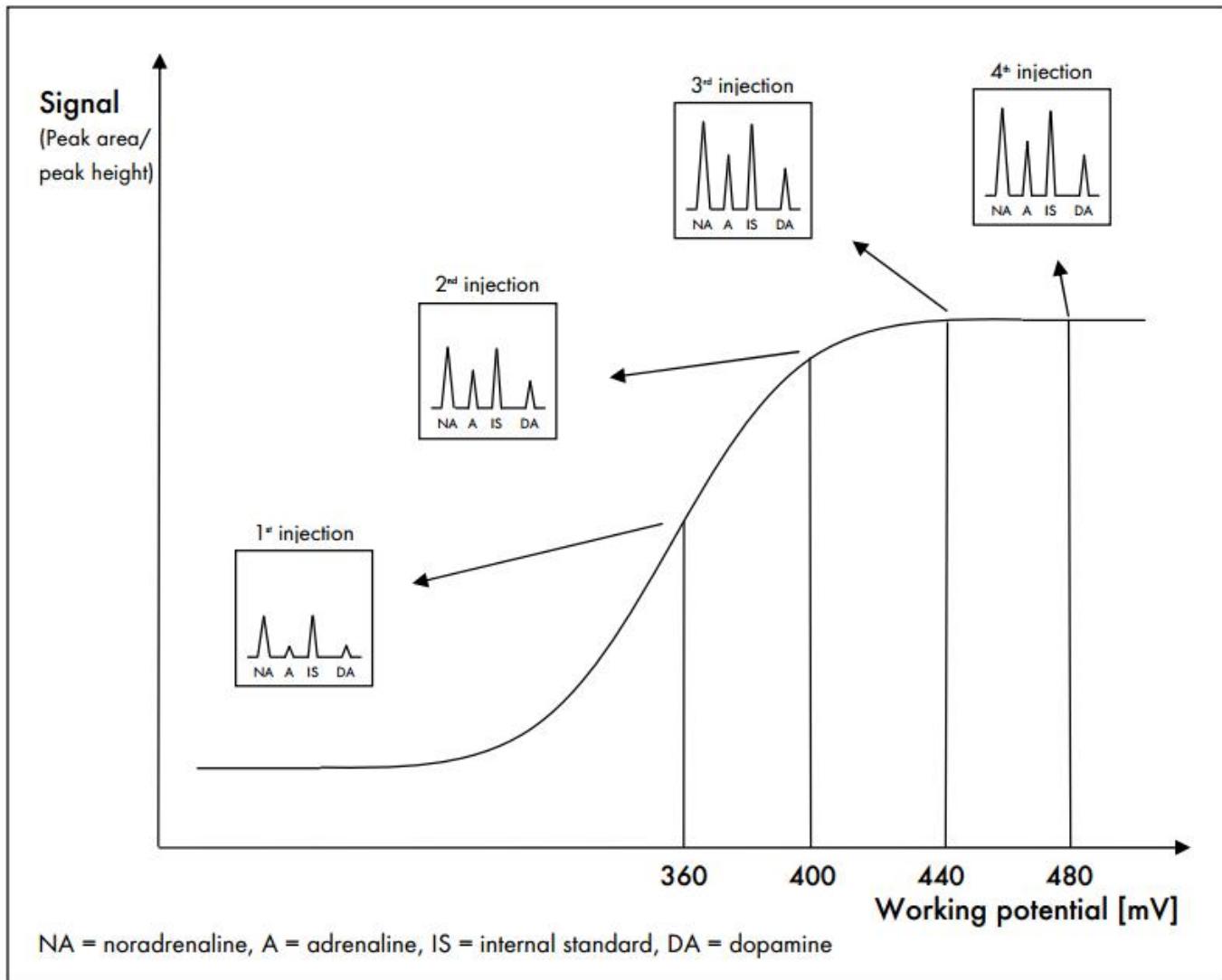


Figura 4 – Otimização do potencial de trabalho

## 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 Parâmetros de equipamentos e instrumentos

A determinação de catecolaminas no plasma requer um sistema isocrático com bomba 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: 20–50 µl

Tempo de execução: aprox. 20 minutos

Taxa de fluxo: 1,0 ml/min\*

Temperatura da coluna: +20 a +25 °C

Pressão da coluna: aprox. 55–200 barras

Detector eletroquímico: potencial de trabalho: aprox. +400 a +500 mV  
corrente de fundo: <3 nA

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

\*Esta taxa de fluxo serve como base para otimização e pode variar entre 0,8 e 1,3 ml/min.

## 4.2 Coluna cromatográfica

A coluna HPLC para determinação de catecolaminas no plasma é fornecida equilibrada e testada, pronta para uso. Pode ser usado diretamente. A contrapressão de uma nova coluna a uma vazão de 1,0 ml/min é ca. 55 barras. 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.

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 ca. 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 0,8–1,3 ml/min até que a linha de base se estabilize
6. Injeite 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 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. Em seguida, inicie o procedimento, bombeando uma solução aquosa de ácido nítrico 15 - 20%, com um fluxo entre 1 e 2 mL/min, durante 20 minutos. Permita que a solução de ácido nítrico também passe através do sistema de injeção. 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, lave o ácido nítrico do sistema com água bidestilada, ativando novamente o procedimento de injeção várias vezes. O pH da água de lavagem efluente deve atingir o pH da água que entra antes de reequilibrar novamente o sistema com a fase móvel.

#### 4.3.2 Eletrodo de trabalho (Ativação)

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

Se você tiver alguma dúvida sobre a ativação do seu eletrodo de trabalho, entre em contato diretamente com o representante local da Chromsystems ou com nossa equipe de suporte da Chromsystems ligando para nossa linha direta +49 8918930-111 ou por e-mail em [support@chromsystems.com](mailto:support@chromsystems.com).

#### 4.4.3 Eletrodo de referência

(Somente aplicável para os detectores eletroquímicos da Chromsystems)

Com o tempo, os íons da solução de cloreto de potássio (3 mol/L) 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 mol/L 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. 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).

#### 4.3.4 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, 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.
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.
5. **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.

Tabela 1: Tempos de retenção

Substância analisada	Tempo de retenção (aprox. min)
Noradrenalina	5,5
Adrenalina	7
Padrão Interno (DHBA)	11
Dopamina	17

A duração da separação cromatográfica é de cerca de 20 minutos para um caudal 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 capítulo 10 deste manual.

### 6.1 Coleta e armazenamento de amostras de plasma

Amostras de sangue devem ser retiradas do paciente recostado através de uma cânula borboleta inserida 20-30 minutos mais cedo. A cânula é mantida aberta pela infusão de solução fisiológica de cloreto de sódio [3]. As amostras de sangue devem ser centrifugadas dentro de 1 hora [24].

Para armazenamentos mais longos, pode ser utilizado glutationa para a estabilização das amostras dos pacientes [23]. O seguinte procedimento pode ser utilizado:

Para cada mL de sangue coletado, deverá ser adicionado 20 $\mu$ L da seguinte solução estabilizante: 144 mg/ml de EGTA (Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiléter-N,N,N,N-tetracético) e 72 mg/ml de glutationa em água. Ajuste o pH para 6.4-7.0 com 6 N NaOH. Possivelmente, as substâncias não se dissolveram até que o NaOH tenha sido adicionado. Após a coleta do sangue, inverta cuidadosamente para garantir a mistura adequada do sangue com a solução estabilizante. Então centrifuge o sangue preparado.

**Nota:** Para a coleta de sangue, tubos especiais com reagentes de estabilização estão disponíveis em Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht, Germany (Kabevette® N Catecholamines 792 N 7.5 - order no. 100490).

As amostras de plasma são estáveis a +20-25°C por um dia, a +4-8°C por dois dias, e a -20°C por um mês. Se as amostras forem estabilizadas por glutationa, elas serão estáveis por seis meses a -20°C [23, 24].

**Nota:** É de responsabilidade individual dos laboratórios usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para seu laboratório.

## 6.2 Reconstituição do padrão de calibração em plasma

Antes da preparação da amostra, reconstitua o calibrador de plasma (nº de pedido 5009) da seguinte forma:

1. Pipete 2,5 ml de água destilada no frasco original
2. Reconstituir durante 10 a 15 min a +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se ainda estiverem visíveis substâncias não dissolvidas, prolongue o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz solar direta.

Os níveis do calibrador são rastreáveis aos pesos iniciais de substâncias puras. As concentrações do analito no calibrador dependem do lote. Os níveis individuais são fornecidos no folheto do calibrador.

### Atenção:

Este produto é fabricado a partir de pool de plasma humano que foi testado pelo fabricante e considerado negativo para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infeciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infeciosas.

### Validade do padrão reconstituído:

Os calibradores dissolvidos em água têm as seguintes vidas úteis:

Tabela 2: Estabilidade dos calibradores após reconstituição

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

## 6.3 Reconstituição dos controles

Antes da preparação da amostra, reconstitua os controlos de plasma (artigo 0010, 0020) da seguinte forma:

1. Pipete 5,0 ml de água destilada no frasco original
2. Reconstituir durante 10 a 15 min a +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se ainda estiverem visíveis substâncias não dissolvidas, prolongue o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz solar direta.

As concentrações do analito nos controlos dependem do lote. Os níveis individuais são fornecidos no folheto que acompanha cada controle.

### Atenção:

Este produto é fabricado a partir de pool de plasma humano que foi testado pelo fabricante e considerado negativo para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e a bactéria Treponema pallidum. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

### Validade dos controlos reconstituídos:

Os controlos dissolvidos em água têm as seguintes vidas úteis:

Tabela 3: Estabilidade dos controlos após reconstituição

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

## 6.4 Procedimento de preparo das amostras

### Etapa de extração:

1. Adicione 500µl de solução tampão de extração na coluna de preparo de amostras. Agite-a por alguns segundos.
2. Adicione 1,0\* mL de amostra/calibrador/controle.
3. Adicione 50 µL do Padrão Interno.
4. Tampe a parte superior da coluna de extração e agite-a, por inversão, durante 10 minutos.
5. Remova a tampa inferior da coluna e permita a eluição da solução, por vácuo ou através de centrifugação (1 min a 700 x g).

### Etapas de limpeza:

6. Feche o tampão inferior e adicione 1 ml de tampão de lavagem
7. Feche a tampa e agite brevemente (vortex)
8. Primeiro remova o tampão superior, depois o tampão inferior e remova o sobrenadante por vácuo ou centrifugação (1 min a 700 xg)

Repita as etapas de lavagem mais duas vezes, após a última etapa de lavagem centrifugar 2 min a 2800 x g. Para garantir que o tampão de lavagem seja completamente removido, bata levemente no cartucho; a alumina deve se soltar da frita.

#### Eluição:

9. Descarte o tampão inferior e conecte o frasco de plástico (nº de pedido 5007/Vi) à saída da coluna de limpeza de amostra.
10. Adicione 120 µl de tampão de eluição
11. Feche a tampa e agite brevemente, depois espere 5 minutos
12. Misture 30 s (vórtice)
13. Centrifugue por 1 min a 700 x g no frasco plástico anexo

#### Análise por HPLC:

14. Injete de 20 - 50 µL da amostra eluída.

\*Se necessário, o volume da amostra pode ser aumentado até 1,5 ml.

**Nota:** Os frascos de plástico fornecidos (artigo 5007/Vi) correspondem aos minifrascos para o autoinjetor WISP da Waters Chromatography, Eschborn. Os usuários do amostrador automático WISP podem transferir o frasco de amostra com o eluato coletado diretamente para seu amostrador automático.

Naturalmente, o eluato também pode ser centrifugado diretamente em qualquer outro frasco de amostra do amostrador automático. Para isso, o cartucho de preparação de amostra é colocado no frasco de amostra e ambos são colocados juntos em um tubo de centrífuga descartável. Por centrifugação curta (1 minuto a 700 x g) o eluato é centrifugado diretamente no frasco de amostra correspondente.

## 6.5 Prazo de validade das amostras

As amostras preparadas para análise conforme indicado na seção 6.4 têm o seguinte prazo de validade:

Tabela 4: Vida útil de armazenamento das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 a +8 °C	5 dias Dopamina: 2 dias	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro
Abaixo de -18 °C	14 dias Dopamina: 5 dias	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro

## 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 o calibrador aquoso (artigo 5003) ou o calibrador de plasma (artigo 5009). A concentração do analito no calibrador depende do lote.

Injete repetidamente uma alíquota do calibrador aquoso ou do calibrador de plasma preparado 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).

**a) Utilizando a solução padrão de calibração aquosa (n° 5003):**

Este padrão é diretamente injetado no sistema de HPLC, sem passar pela etapa de preparo de amostra.

Substância analisada	Tempo de retenção (aprox. min)	Concentração (ng/L)*
Noradrenalina	5,5	600
Adrenalina	7	300
Padrão Interno (DHBA)	11	1
Dopamina	17	300

(\*Para preparo de amostras de paciente é utilizado 1,0 mL de plasma).

**b) Utilizando o padrão de calibração liofilizado em plasma (n° 5009):**

Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (ng/L ou pmol/L)
Noradrenalina	5,5	Ver folheto informativo
Adrenalina	7	Ver folheto informativo
Padrão Interno (DHBA)	11	1
Dopamina	17	Ver folheto informativo

O calibrador de plasma é submetido a todo o preparo da amostra, de forma análoga às amostras dos pacientes. As concentrações do analito no calibrador dependem do lote. Os níveis individuais são fornecidos no folheto do calibrador.

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

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). Na análise de catecolaminas, o padrão interno será o pico n° 3 no cromatograma do padrão de calibração.

**Composição da solução padrão de calibração (n° 5003):**

Noradrenalina: 5000 µg/L  
 Adrenalina: 2500 µg/L  
 Dopamina: 2500 µg/L  
 Padrão Interno (DHBA): 5000 µg/L

O procedimento de preparo da amostra produz um fator de concentração da amostra de 8,333 (1 mL de plasma → 0,12 mL eluato). Logo, as concentrações das substâncias analisadas presentes no padrão de calibração devem ser consideradas como frações 1/8,333 dos valores acima descritos, fornecendo as seguintes concentrações:

Noradrenalina: 600 pg/L  
 Adrenalina: 300 pg/L  
 Dopamina: 300 pg/L

Padrão Interno (DHBA): 600 pg/L

**Concentração do Padrão Interno:** Dihidroxibenzzilamina (DHBA): 12 pg/µL

São adicionados 50 µL de solução padrão interna em 1 mL de plasma. A concentração final de padrão interno na amostra é portanto de 600 pg/mL. 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".

**Se um volume maior de plasma (1,5 mL) for utilizado no preparo da amostra, os cálculos deverão ser refeitos e tal valor deverá ser considerado na avaliação quantitativa.**

Quando for utilizado o padrão de calibração liofilizado em plasma (nº 5009) 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.

## 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 0010 e 0020).

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

Os intervalos de referência indicados são guias baseados na literatura [6]. Eles podem diferir de outros dados publicados. Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine intervalos de referência específicos para o seu laboratório. Ao determinar os intervalos, certifique-se de cumprir os requisitos nacionais locais.

Analito	nmol/l	ng/l
Noradrenalina	0,47-2,95	80-499
Adrenalina	0,02-0,45	3,7-82
Dopamina	0,013-0,379	2-58

## 10 Fatores de conversão

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

Substância analisada	ng/L para pmol/L	pmol/L para ng/L
Noradrenalina	5,9102	0,1692
Adrenalina	5,4585	0,1832
Dopamina	6,5274	0,1532

## 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 estocagem indicados no rótulo sejam obedecidas.

**Condições de armazenamento dos reagentes:**

Produto	Armazenamento
Kit de reagente	+18 a +30°C
Fase Móvel	+18 a +30°C
Padrão Interno	+2 a +8 °C
Tampão de Extração	+18 a +30°C
Tampão de Limpeza	+18 a +30°C
Tampão de Eluição	+18 a +30°C
Colunas de Extração	+18 a +30°C
Padrão de Calibração	+2 a +8 °C
Padrão de Calibração em plasma	+2 a +8 °C
Controles em plasma 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 6.2 e 6.3 deste Manual.

## 12 Descarte de resíduos

A Fase Móvel contém solventes orgânicos. Descartar os resíduos do produto em recipiente coletor para solventes orgânicos livres de halogênio.

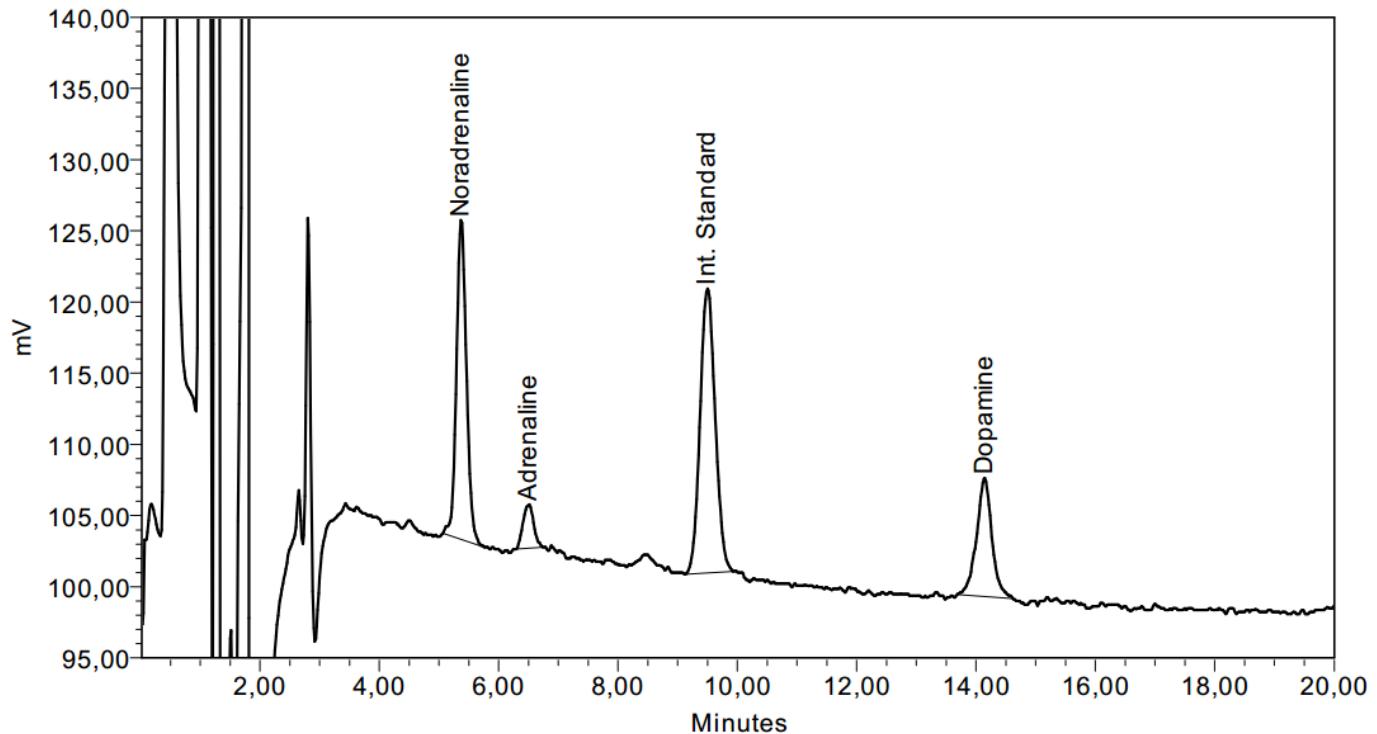
O Padrão Interno e o Padrão de Calibração são soluções ácidas, o Tampão de Extração contém um sal classificado como perigoso. Neutralize os resíduos do produto e descarte em recipiente coletor de soluções salinas.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, bem como controlos e calibradores devem ser recolhidos e eliminados como resíduos potencialmente infecciosos.

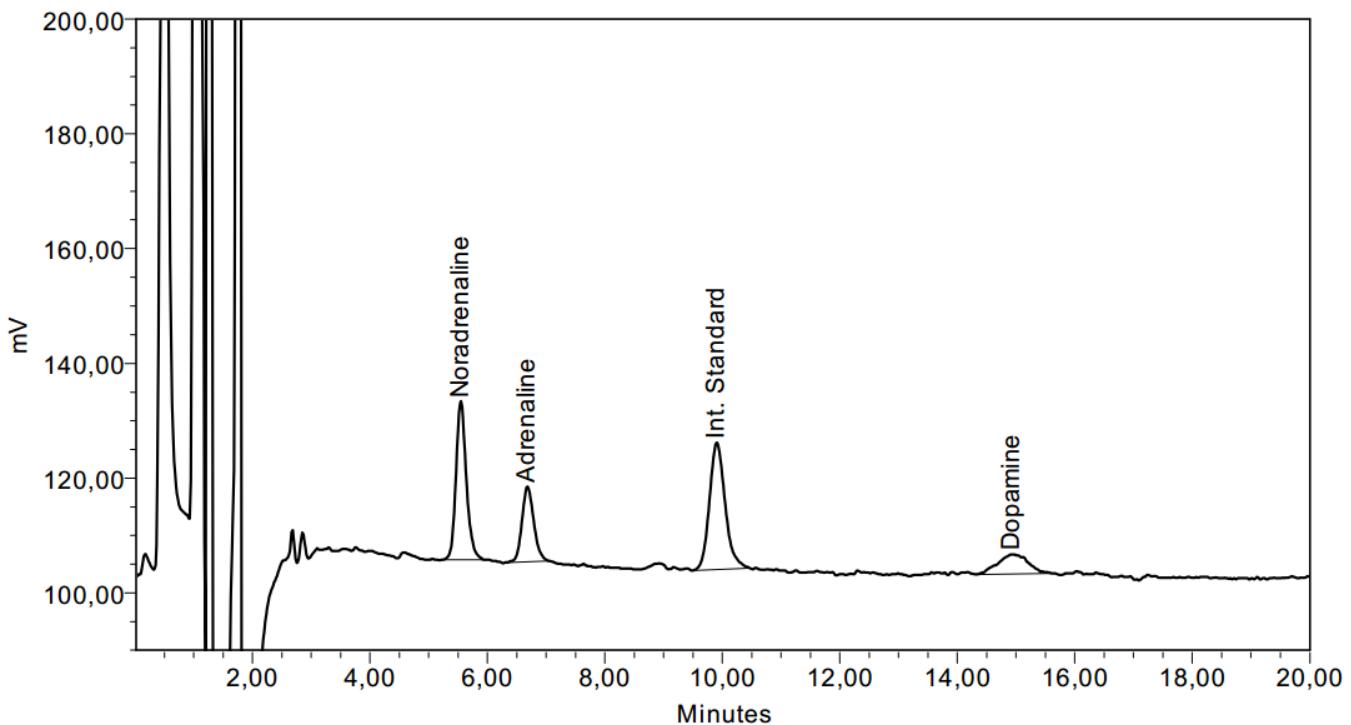
As soluções mencionadas não devem ser eliminadas juntamente com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Descarte em conformidade com a Diretiva 2008/98/EC sobre Resíduos e com os requisitos nacionais e locais. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e somente o acesso permitido a pessoas autorizadas.

## 13 Exemplos de cromatogramas

### 13.1 Cromatograma de um calibrador em plasma



### 13.2 Cromatograma de um controle em plasma (nível patológico)



## 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 (ativar) 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	Verifique a bomba, remova as 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	Fornece 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	Passivate pump, capillaries and injection system with nitric acid (Cap. 4.3.1)
	Fase móvel contaminada	Substituir a fase móvel
	Coluna de HPLC contaminada	Limpar (ativar) o eletrodo de

		trabalho (Cap. 4.3.2)
	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar (ativar) o eletrodo de trabalho (Cap. 4.3.2)
Perda de sensibilidade do sinal ou perda de sinal	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar (ativar) o eletrodo de trabalho (Cap 4.3.2)
	Falha no potencial de trabalho	Verifique o potencial entre o eletrodo de trabalho e de referência; se estiver muito baixo, faça a manutenção do eletrodo de referência (Cap. 4.3.3)
Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura ambiente	Garantir uma temperatura ambiente constante para a coluna; coluna do termostato.
	Fluxo irregular	Meça a taxa de fluxo. Se o fluxo da bomba estiver irregular, verifique se há bolhas de ar no sistema; ligue para o serviço 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	Procedimento de peroxidação

	eletroquimicamente ativas	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	Verifique o empacotamento da coluna na entrada; verifique os acoplamentos capilares quanto ao assentamento correto
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
	Obstrução do sistema de injeção	Limpar o sistema com água e posteriormente isopropanol e novamente com água

## 15 Literatura

1. Cooper JR, Bloom RH, The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 5<sup>th</sup> Edition, New York, Oxford University Press (1986).
2. Wisser H, Knoll E, Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag Stuttgart (Hsrg. H. Greiling und AM Gressner) (1987).
3. Bravo EL, Gifford RW, Pheochromocytoma: Diagnosis, Localization and Management, N Engl. J Med. 311:1298-1303 (1984).
4. Bravo EL, The Clinical Value of Catecholamine Measurement, Laboratory Management (Jun 1982).
5. Proye C, Fossati P, Fontaine P, Lefebvre J, Decoulx M, Wemeau JL, Dewailly D, Rwamasirabo E, Cecat P, Dopamine-secreting pheochromocytoma: an unrecognized entity? Classification of pheochromocytomas according to their type of secretion, Surgery 6, 1154-1162 (1986).
6. Thomas L, Labor und Diagnose. 8<sup>th</sup> Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2012).
7. Ratge D, Baumgardt G, Knoll E, Wisser H, Plasma free and conjugated catecholamines in diagnosis and localization of pheochromocytoma, Clin Chem Acta, 132:229-243 (1983).
8. Grobecker H, Saavedra JM, Dominiak P, Catecholamines in experimental and essential hypertension. In: The Heart in Hypertension, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 109-121 (1981).
9. Folkow B. (1984) Plasma catecholamines as markers for sympathoadrenal activity in man. Introductory remarks. Acta Physiol Scand Suppl 527: 7-9.
10. Christensen NJ, Catecholamines and Diabetes Mellitus, Diabetologia, 16:211 (1979).
11. Lake CR, Sternberg DE, Van Kammen DP, Ballenger JC, Ziegler MG, Post RM, Kopin IJ, Bunney WE, Schizophrenia: Elevated Cerebrospinal Fluid Norepinephrine, Science 207:311 (1980).
12. Borg S, Kvande H, Sedvall G, Central Norepinephrine Metabolism During Alcohol Intoxication in Addicts and Healthy Volunteers, Science 213:1135 (1981).
13. Kauert G, Schoppek B, Clarmann VM, Hibler A, Plasma Katecholamin-Verlauf bei Alkylphosphat-Intoxikationen und deren Therapie, Klin Wochenschr. 67:456-462 (1989).
14. Darwish R, Elias AN, Plasma and Urinary Catecholamines and their Metabolites in chronic renal failure, Arch Intern Med. Vol 114, Jan 1984.
15. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure, N Engl. J Med. 311:819-823 (1984).
16. Goldstein DS, Plasma Catecholamines in Clinical Studies of Cardiovascular Diseases, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:39-41 (1984).
17. Elworthy PM, Hitchcock ER, Estimation of plasma catecholamines by HPLC with ECD in patients with subarachnoid hemorrhage.
18. Ind PW, Causon RC, Brown MJ, Barnes PJ, Circulating Catecholamines in Acute Asthma, British Medical Journal, Volume 20 (1985).
19. Halter JB, Stratton JR, Pfeifer MA, Plasma catecholamines in hemodynamic responses to stress states in man, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:31-38 (1984).
20. Hjemdahl P, Freyschuss U, Juhlin-Dahnfeld A, Linde B, Differentiated sympathetic activation during mental stress evoked by the stroop test, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:25-29 (1984).
21. Weicker H, Determination of free and sulfoconjugated catecholamines in plasma and urine by HPLC, Int J Sports Med. 9: 68-74 Suppl. (1988).
22. Pluto R, Bürger P, Normal values of catecholamines in blood plasma determined by HPLC with amperometric detection, Int J Sports Med. 9: 75-78 Suppl. (1988).

23. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schimitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Quality of Diagnostic Samples: Recommendations of the working group on preanalytical quality of the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 3<sup>th</sup> edition. (2009).
24. Boomsma F, Alberts G, van Eijk L, Man in 't Veld AJ, Schalekamp MA. Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine. Clin Chem 39(12): 2503-8.

## Apêndice I: 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](http://www.chromsystems.de)) ou mediante solicitação.

Produto	Risco
Fase Móvel (artigo 5001/5002)	<p>Perigo</p> <p>H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode causar danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p> <p>P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico.</p> <p>P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água.</p> <p>P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Tampão de Extração (artigo 5011)	<p>Perigo</p> <p>H315 Causa irritação na pele.</p> <p>H319 Causa séria irritação aos olhos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p> <p>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.</p>
Padrão de Calibração (artigo 5003)	<p>Perigo</p> <p>H290 Pode ser corrosivo a metais.</p>
Padrão Interno (artigo 5004)	<p>Perigo</p> <p>H290 Pode ser corrosivo a metais.</p>
<p><b>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:</b></p> <p>Padrão de calibração em plasma (artigo 5009)</p> <p>Tampão de lavagem (artigo 5005)</p> <p>Tampão de eluição (artigo 5006)</p> <p>Controles endócrinos em plasma (artigo 0010, 0020)</p> <p>Fase móvel L-DOPA, DHPG, DOPAC (artigo 5031)</p> <p>Solução KCl 3M (artigo 41239)</p>	

## Apêndice II: Cálculo manual

### a) Usando o calibrador de plasma (artigo 5009):

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra	= A <sub>Amostra</sub>
Área/altura do pico da substância A no cromatograma do padrão de calibração	= A <sub>Padrão</sub>
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= IS <sub>Amostra</sub>
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do padrão de calibração	= IS <sub>Padrão</sub>
A concentração C da substância A no padrão de calibração	= C <sub>Padrão</sub>

A concentração C<sub>Análise, Amostra</sub> na amostra é então calculada como a seguir:

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

### b) Usando o calibrador aquoso (artigo 5003):

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra	= A <sub>Amostra</sub>
Área/altura do pico da substância A no cromatograma do padrão de calibração	= A <sub>Padrão</sub>
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= IS <sub>Amostra</sub>
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do padrão de calibração	= IS <sub>Padrão</sub>
A concentração C da substância A no padrão de calibração	= C <sub>Padrão</sub>

A concentração C<sub>Análise, Amostra</sub> na amostra é então calculada como a seguir:

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

Fatores para esta fórmula (para 1 ml de plasma):

Noradrenalina: 600

Adrenalina: 300

Dopamina: 300

## Apêndice III: Validação

Para checar a linearidade e para validar o método, foram utilizadas amostras de plasma acrescentadas de quantidades definidas de catecolaminas. Alíquotas múltiplas dessas amostras foram submetidas ao procedimento descrito neste manual.

### Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do slope das curvas de calibração de amostras de plasma e soluções padrão diluídas.

Substância analisada	Recuperação (%)
Noradrenalina	74
Adrenalina	71
Dopamina	40
Padrão Interno (DHBA)	66

### Linearidade e limite de quantificação

O método é linear desde o limite inferior de quantificação (LLOQ) até o limite superior de quantificação declarado (faixa linear).

Substância analisada	LLOQ* (ng/L)	Limite máximo (ng/L)
Noradrenalina	43	4500
Adrenalina	18	2250
Dopamina	81	3500

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

### Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi feita por meio de múltiplas preparações ( $n = 10$ ) da mesma amostra e determinação da concentração do analito em 3 concentrações diferentes:

Substância analisada	Coeficiente de variação [%] (concentração ng/L)		
	$n=10$	$n=10$	$n=10$
Noradrenalina	2,0 (252)	1,7 (1808)	1,5 (1126)
Adrenalina	3,3 (79,9)	2,9 (579)	1,5 (236)
Dopamina	3,4 (234)	3,7 (574)	1,6 (418)

### Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir do preparo e determinação em quadruplicada da concentração de analito em pool de plasma nas faixas normais e patológicas em 20 séries de testes diferentes.

Substância analisada	Coeficiente de variação (concentração ng/L)	
	$n=80$	$n=80$
Noradrenalina	5,5 (256)	3,1 (1894)
Adrenalina	5,2 (81,4)	3,3 (488)
Dopamina	13,1 (215)	12,5 (963)

Estes dados foram estabelecidos no nosso laboratório apenas para verificar o desempenho do kit de reagentes e para cumprir os requisitos regulamentares. Enfatizamos particularmente que estes dados não são adequados para comparar os sistemas de medição utilizados, nem para fazer qualquer afirmação sobre o seu desempenho geral.

## Apêndice IV: 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 63823, term "Multiple biogenic amine neurotransmitter IVD, kit, liquid chromatography"

EDMA-Nomenclature term: Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine

EDMA-Nomenclature code: 12-06-30-01-00

IVDD Classification: other product

Product name: **5000 – Catecholamines in Plasma**

Calibrators: **5003 – Calibration Standard**

**5009 – Plasma Calibration Standard**

Controls: **0010 – Plasma Endocrine Control, Normal Range**

**0020 – Plasma Endocrine 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, July 07<sup>th</sup>, 2020



Michael Meier, Managing Director

EC declaration valid until May 26<sup>th</sup>, 2022

Vers. 4.0  
Page 1 von 1

Chromsystems  
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12  
82166 Gräfelfing/Germany

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

mailto:info@chromsystems.com  
www.chromsystems.com

 Management system certified according to:  
ISO 9001, ISO 13485 (including MDSAP)

## Apêndice V: 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 15: 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