

# CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

BIOGENE AMINE  
BIOGENIC AMINES  
AMINES BIOGÈNES  
AMMINE BIOGENE  
AMINAS BIÓGENAS



Manual de Instrução para a Análise em HPLC de  
Catecolaminas  
em Urina

**Somente para uso diagnóstico *in vitro***  
Artigo 6000

## CATECOLAMINAS EM URINA POR HPLC MS 10350840114

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 .....	6
3 Teoria da detecção eletroquímica .....	8
3.1 Princípios gerais .....	8
3.2 Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica .....	8
3.3 Otimização do potencial de trabalho .....	9
4 Sistema de HPLC .....	10
4.1 Instalando o equipamento.....	10
4.2 Parâmetros cromatográficos .....	10
4.3 Coluna cromatográfica .....	11
4.4 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC.....	11
4.4.1 Bomba e tubulações .....	11
4.4.2 Eletrodo de trabalho .....	12
4.4.3 Eletrodo de referência .....	12
4.4.4 Evitando flutuações de fluxo da bomba.....	13
4.4.5 Desligando o equipamento.....	13
5 Preparação da amostra .....	13
5.1 Coleta e armazenamento de amostras de urina .....	13
5.2 Reconstituição do padrão de calibração em urina .....	13
5.3 Reconstituição dos controles .....	14
5.4 Procedimento de preparação das amostras .....	14
5.5 Preparação das amostras – resumo .....	15
5.6 Prazo de validade das amostras preparadas (eluatós).....	16
6 Resultados e avaliação .....	16
6.1 Calibração do sistema.....	16
6.2 Quantificação com Padrão Interno .....	16
7 Controle de Qualidade .....	17
8 Valores de referência .....	17
9 Fatores de conversão .....	17
10 Armazenamento e validade dos reagentes .....	17
11 Descarte de resíduos.....	18
12 Exemplos de cromatogramas .....	19
12.1 Cromatograma de um padrão de calibração aquoso .....	19
12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente .....	19
13 Problemas e Soluções.....	20
14 Literatura.....	22
Apêndice I: Preparo automatizado das amostras com Gilson ASPEC™ .....	23
Apêndice II: Informações de segurança.....	25
Apêndice III: Cálculo manual .....	26
Apêndice IV: Validação.....	27
Apêndice V: Declaração de Conformidade .....	28

# 1 Informações gerais

Nº do artigo	Produto
6000	<p>Kit de reagentes para análise por HPLC de Catecolaminas em urina. Para 100 análises.</p> <p><b>Componentes do Kit:</b></p> <p>Fase móvel 1000 mL            Padrão de calibração 10 mL            Padrão Interno 10 mL            Solução tampão de neutralização 2 x 300 mL            Solução tampão de eluição 2 x 300 mL            Colunas de preparo de amostras 100 unidades</p> <p><b>Componentes disponíveis separadamente:</b></p> <p>5001 Fase móvel 1000 mL            5002 Fase móvel 10 x 1000 mL            6003 Padrão de calibração 10 mL            6009 Padrão de calibração liofilizado em urina 5 x 10 ml            6004 Padrão Interno 10 mL            6055 Solução tampão de neutralização 300 mL            6006 Solução tampão de eluição 300 mL            6007 Colunas de preparo de amostras 100 unidades</p>
6000/A1	<p>Kit de reagentes para HPLC Preparo com Gilson® ASPEC™ Para 100 análises</p> <p>Fase móvel 1000 mL            Padrão de calibração em urina (liof.) 10 mL            Padrão Interno 6 mL            Tampão de Neutralização 300 mL            Tampão de Eluição 250 mL            Colunas de preparo de amostras com tampas DEC 2 x 50 unidades</p>
6000/A5	<p>Kit de reagentes para HPLC Preparo com Gilson® ASPECTM Para 500 análises</p> <p>Fase móvel 3 x 1000 mL            Padrão de calibração em urina (liof.) 5 x 10 mL            Padrão Interno 30 mL            Tampão de Neutralização 5 x 300 mL            Tampão de Eluição 5 x 250 mL            Colunas de preparo de amostras com tampas DEC 10 x 50 unidades</p>
6000/A9	<p>Kit de reagentes para HPLC Preparo com Gilson® ASPECTM Para 1000 análises</p> <p>Fase móvel 6 x 1000 mL</p>

	Padrão de calibração em urina (liof.)	5 x 10 mL
	Padrão Interno	2 x 30 mL
	Tampão de Neutralização	3000 mL
	Tampão de Eluição	2500 mL
	Colunas de preparo de amostras com tampas DEC	20 x 50 unidades
	<b>Componentes disponíveis separadamente para Gilson® ASPEC™:</b>	
5001	Fase Móvel	1000 mL
6009/T	Padrão de Calibração em Urina (liof.)	10 mL
6009	Padrão de Calibração em Urina (liof.)	5 x 10 mL
6004/A1	Padrão Interno	6 mL
6004/A5	Padrão Interno	30 mL
6008/A1	Tampão de Neutralização	300 mL
6008/A9	Tampão de Neutralização	3000 mL
6006/A9	Tampão de Eluição	2500 mL
6007/A	Colunas de preparação de amostras com tampas DEC	50 unidades
	<b>Acessórios</b>	
6100	Coluna para HPLC. (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
	<b>Calibradores e Controles Chromsystems para Catecolaminas em Urina</b>	
6003	Padrão de Calibração	10 ml
6009	Padrão de Calibração em Urina (liof.)	5 x 10 ml
0040	Controle endócrino em urina, nível normal (liof.)	10 x 8 ml
0050	Controle endócrino em urina, nível patológico (liof.)	10 x 8 ml
	<b>Acessórios para detetores 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).

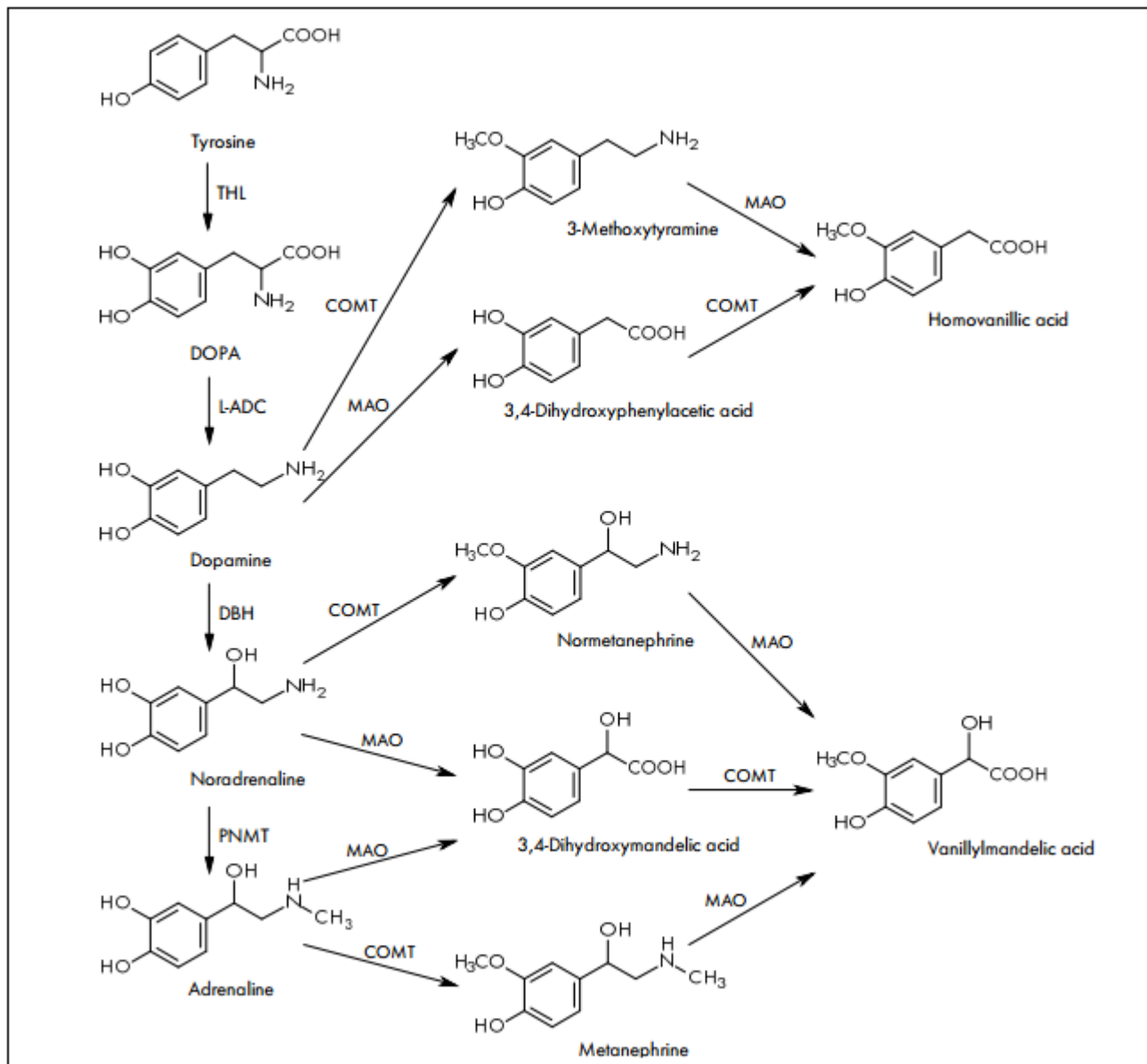


Figura 1 – Metabolismo das Catecolaminas e metanefrinas

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 em urina da Chromsystems® é uma ferramenta de diagnóstico in vitro para ser usada em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa de adrenalina, noradrenalina e dopamina em amostras de urina de pacientes através de HPLC (cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica). É indicado como teste de monitoramento em pacientes com suspeita de tumores secretores de catecolaminas.

**Princípio do kit de reagentes:**

Este kit de reagentes foi desenvolvido para a determinação confiável por HPLC de adrenalina, noradrenalina e dopamina em urina. Antes da separação cromatográfica, os analitos são separados da matriz urinária por troca iônica. A preparação da amostra requer ajuste do pH da urina diluída, transferência para a coluna de limpeza de amostra e duas etapas de lavagem.

Uma coluna cromatográfica seletiva, em combinação 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. O método analítico fornece resultados rápidos e confiáveis e, portanto, é adequado para análises de rotina.

### 3 Teoria da detecção eletroquímica

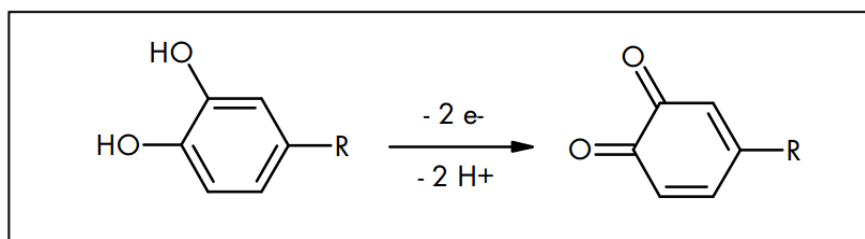
#### 3.1 Princípios gerais

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 2.

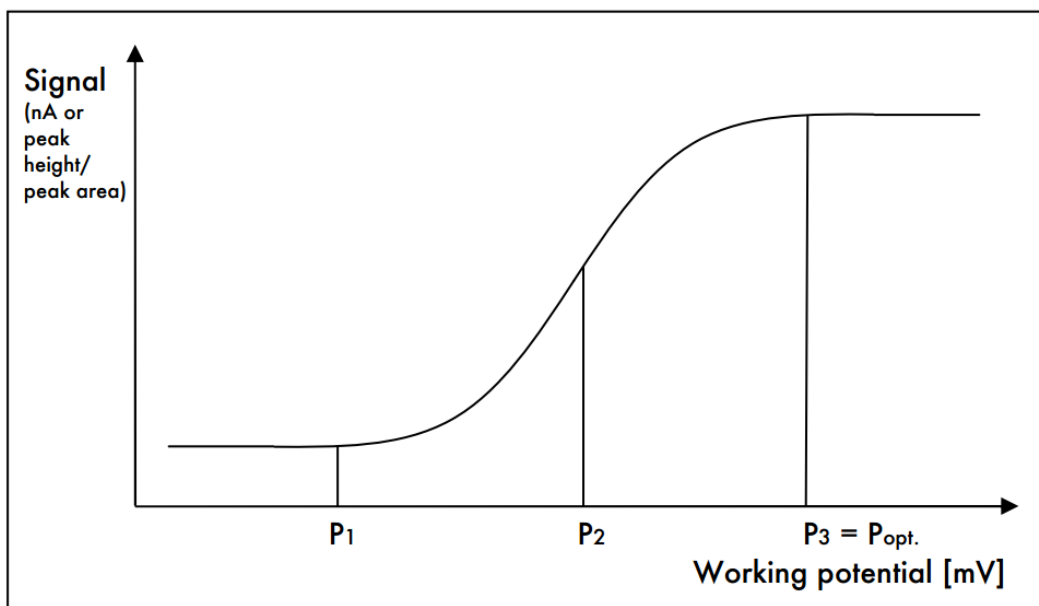


Figura 2 – Correlação entre potencial de trabalho e detector de sinal.



Analisando o gráfico anterior, pode-se observar que em um potencial igual ou menor do que  $P_1$  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 seção 3.2) 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 (artigo 6003), uma vez que sua transformação eletroquímica requer o maior potencial de trabalho. Para tanto, o seguinte procedimento é recomendado (ver Figura 3):

1. Ajuste o potencial de trabalho em +360mV e injete o padrão de calibração (artigo 6003) 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 (artigo 6003) 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.

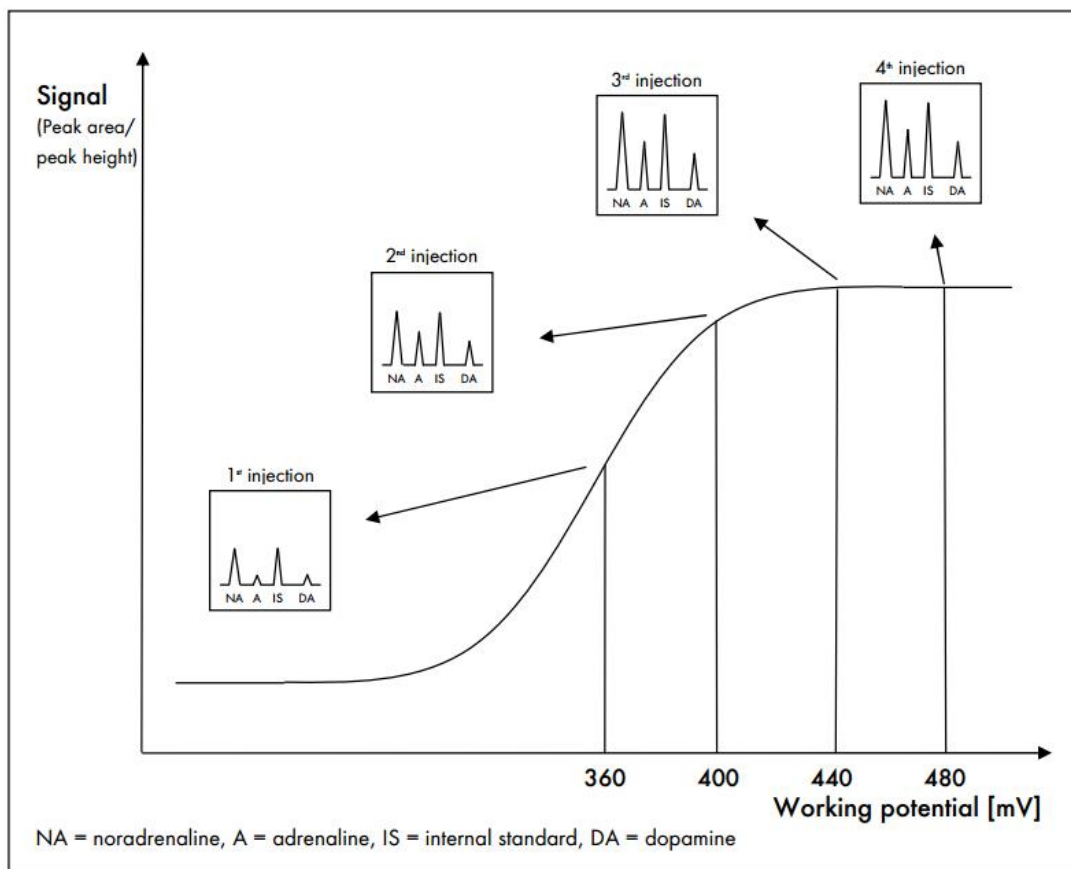


Figura 3 – Otimização do potencial de trabalho

## 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 1mL/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 com 5% 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 catecolaminas correspondente ao valor de platô determinado experimentalmente (ver seção 3.2). Para a detecção de catecolaminas e de DHBA (padrão

interno) o valor do potencial de trabalho geralmente está entre 400 e 500mV (com eletrodo de referência de Ag/AgCl). Após equilíbrio, o valor de corrente da linha de base não deve exceder 3 nA.

#### Separação cromatográfica:

1. Ajuste o fluxo em um valor entre 0,8 e 1,3 mL/min. A pressão da coluna não deve exceder 200 bar.
2. A separação cromatográfica pode ser conduzida em temperatura ambiente, mas a temperatura deve ser mantida o mais constante possível. Variações de temperatura, e conseqüente variações no tempo de retenção dos picos, podem ser evitadas com a utilização de um forno para coluna.

Não é necessário desgaseificar a fase móvel antes do uso. Quando o sistema estiver equilibrado, a fase móvel pode ser colocada no modo de recirculação.

**Nota:** A desgaseificação da fase móvel reduz o conteúdo de solventes orgânicos da fase móvel. Isto altera a separação cromatográfica das catecolaminas e leva a aumentos significativos do tempo de retenção.

Analito	Tempo de retenção (fluxo: 1ml/min)
Noradrenalina	aprox. 4,5 min
Adrenalina	aprox. 5,5 min
Padrão interno (DHBA)	aprox. 8,3 min
Dopamina	aprox. 13,5 min

O tempo total de análise é de cerca de 15 minutos. Podem ocorrer variações nos tempos de retenção em  $\pm 10\%$ .

#### 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. Você pode definir os parâmetros de integração (por exemplo, marcadores de início e fim de pico) corretamente com base nos cromatogramas obtidos.

A última injeção pode ser usada para calibração.

## 4.3 Coluna cromatográfica

A coluna para HPLC, utilizada na análise das catecolaminas, 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 75 bar (1100 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).

## 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 da passivação, a coluna e o detector eletroquímico devem ser desconectados! Contudo, mantenha as tubulações de conexão da coluna e do detector, unindo-as com o auxílio de junções.

Antes de enxaguar com ácido nítrico, a fase móvel deve ser lavada com 20 ml de água ultrapura (grau HPLC) a uma vazão de 1,5 ml/min. Em seguida, 15–20% de ácido nítrico é bombeado através do capilar e do sistema de injeção a uma vazão de 1,5 ml/min por 20 min. A unidade de injeção deve realizar o procedimento de injeção diversas vezes: Com um amostrador automático, coloque 15–20% de ácido nítrico nos frascos de amostra e injete um volume tão grande quanto possível. Ao usar um sistema de injeção manual, mude de LOAD para INJECT pelo menos 10 vezes. Após a passivação, lave o ácido nítrico do sistema com água ultrapura (grau HPLC), 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.

### 4.4.2 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 grau HPLC.
6. Recoloque o eletrodo de trabalho na célula analítica. O lado ativo aponta para o interior da célula.
7. Reequilibre novamente o sistema cromatográfico.

### 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).

#### 4.4.4 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 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*. O sistema de HPLC deverá ser lavado com no mínimo 50mL de água/metanol (50:50).
3. 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 deste manual.

As amostras também podem ser preparadas de forma automatizada com Gilson ASPEC™. Por favor checar Apêndice I.

### 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 até 5 dias mantidas em temperaturas entre +2° e +8°C. Para armazenar por períodos maiores, aliquotar e congelar à -18°C.

**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.

### 5.2 Reconstituição do padrão de calibração em urina

O padrão de calibração (artigo 6009) é rastreável a 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 10,0 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 urina humana agrupada. Cada doador que contribui para este produto é constantemente submetido a controle médico e considerado livre de doenças infecciosas. No entanto, este produto ainda apresenta um risco residual de infecção porque não existem métodos de teste absolutamente seguros, os métodos de teste não estão disponíveis para todas as doenças e o produto pode conter agentes patogênicos anteriormente desconhecidos. Portanto, recomendamos considerar todos os produtos que contenham materiais humanos como potencialmente infecciosos. Tenha o mesmo cuidado ao manusear este produto que teria ao manusear amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

**Validade 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. Caso o padrão não seja utilizado dentro deste período, deve ser fracionado e armazenado a -18°C, por um período máximo de 3 meses.

### 5.3 Reconstituição dos controles

Depois de reconstituídos, os controles em urina nível normal (n° 0040) e nível patológico (n° 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 urina humana agrupada. Cada doador que contribui para este produto é constantemente submetido a controle médico e considerado livre de doenças infecciosas. No entanto, este produto ainda apresenta um risco residual de infecção porque não existem métodos de teste absolutamente seguros, os métodos de teste não estão disponíveis para todas as doenças e o produto pode conter agentes patogênicos anteriormente desconhecidos. Portanto, recomendamos considerar todos os produtos que contenham materiais humanos como potencialmente infecciosos. Tenha o mesmo cuidado ao manusear este produto que teria ao manusear amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

**Validade 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 fracionados e armazenados a -18°C, por um período máximo de 3 meses.

### 5.4 Procedimento de preparação das amostras

**Estabilização e pré-diluição das amostras de urina:**

Transferir 3 mL da urina para um recipiente apropriado e adicionar 100 µL do padrão interno. Então, diluir com 6 mL do tampão de neutralização, e adicionar NaOH 2N até que a cor mude de amarelo ao verde ou verde acinzentado (ver figura 4). Para amostras de urina fortemente acidificadas pode ser usada maior concentração de NaOH. A cor verde indica que o valor de pH está ajustado corretamente para a extração subjacente. Se a mistura apresentar cor roxa, indica que o pH está muito alcalino e deve ser diminuído com cuidado pela adição de HCl 2N até que a cor mude para verde.

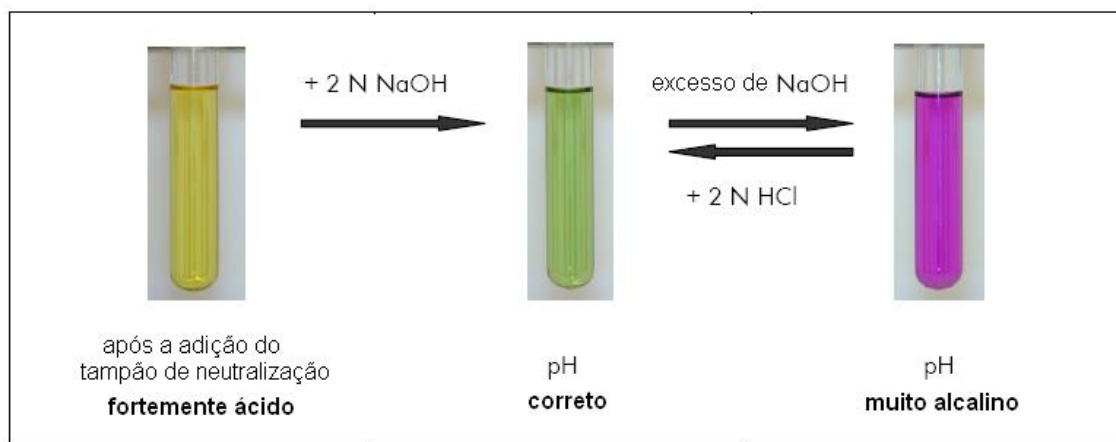


Figura 4 – Ajuste do pH de amostras diluídas

**O ajuste múltiplo de pH ácido/alcalino deve ser evitado, pois pode levar a perdas na recuperação devido a um aumento de sal.**

#### **Extração da amostra com as colunas de limpeza de amostra:**

Agite brevemente (para ressuspender) e identifique uma coluna de preparação para cada amostra a ser analisada. Remova a tampa da coluna e corte a aba. Deixe que o tampão de eluição saia completamente. Coloque todas as amostras de urina diluída nas colunas de limpeza. Descarte o efluente.

#### **Lavagem:**

Lave a coluna de preparação de amostra com dois volumes de coluna de água destilada (use a coluna de preparação da amostra com água destilada até a borda superior e deixe a água correr completamente, repetir essa etapa uma vez). Descarte o efluente.

#### **Eluição:**

Coloque a coluna de preparação da amostra no tubo identificado correspondente, adicione 6 mL do tampão de eluição e colete o eluato. Acidifique o eluato com 180  $\mu\text{L}$  de HCl 5M (30  $\mu\text{L}$  de HCl 5M por mL do eluato).

Injetar 20  $\mu\text{L}$  do eluato no sistema de HPLC.

## **5.5 Preparo das amostras – resumo**

#### **Estabilização e pré-diluição das amostras de urina**

Colocar 3 mL de urina (amostra de paciente, controle ou calibrador) em um recipiente apropriado, adicionar +100  $\mu\text{L}$  do padrão interno, então adicionar +6 mL do tampão de neutralização.

Adicionar NaOH 2N até que a cor mude do amarelo ao verde ou verde acinzentado.

Se a mistura de urina apresentar cor roxa (muito alcalino) diminua o valor do pH com cuidado por adição de HCl 2N até que a cor mude para verde.

#### **Etapa de extração:**

Colocar todo o volume da amostra de urina diluída na coluna de limpeza de amostra. Descarte o efluente.

#### **Lavagem:**

Use a coluna de preparação da amostra com água destilada até a borda superior e deixe a água correr completamente, repetir essa etapa uma vez. Descarte o efluente.

#### **Eluição:**

Adicionar 6 mL do tampão de eluição e coletar o eluato.

**Análise por HPLC:**

Cheque a razão do fluxo, método de integração e a linha de base. Acidifique o eluato com 180 µL de HCl 5M (30 µL de HCl 5M por mL do eluato). Injete de 20 µL do eluato.

**Nota:** O padrão de calibração (artigo 6003) é injetado diretamente no sistema de HPLC, sem o procedimento de preparação da amostra.

**5.6 Prazo de validade das amostras preparadas (eluatos)**

As amostras, em tampão de eluição, são estáveis por 48h se mantidas refrigeradas à +2° a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento, as amostras devem ser congeladas à -18°C.

**6 Resultados e avaliação****6.1 Calibração do sistema**

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:

**Utilizando a solução padrão de calibração (artigo 6003):**

Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/L)
Noradrenalina	4,5	25
Adrenalina	5,5	5
Padrão Interno (DHBA)	8,3	1
Dopamina	13,5	100

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

**Utilizando o padrão de calibração liofilizado em urina (artigo 6009):**

Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/L ou nmol/L)
Noradrenalina	4,5	Ver folheto informativo
Adrenalina	5,5	- " -
Padrão Interno (DHBA)	8,3	1
Dopamina	13,5	Ver folheto informativo

O calibrador de urina é submetido a todo o preparo da amostra, de forma análoga às amostras do paciente. As concentrações dos analitos individuais dependem do lote e podem ser encontradas no folheto informativo que acompanha o padrão.

Para garantir que não ocorreram alterações na calibração ou nas condições de HPLC (tempos de retenção, etc.), uma alíquota adicional do calibrador deve ser injetada durante e no final de uma série de análises.

**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 calibrado aquoso (artigo 6003)



Noradrenalina:	25 ng/ml	(25 µg/l)
Adrenalina:	5 ng/ml	(5 µg/l)
Dopamina:	100 ng/ml	(100 µg/l)
Padrão Interno (DHBA):	50 ng/ml	(50 µg/l)

**Concentração do padrão interno:**

3, 4 – Dihidroxibenzilamina (DHBA) 1,5 ng/µL.

São adicionados 100 µL de solução padrão interno (1,5 ng/µL) em 3 mL de urina. A concentração final de padrão interno na amostra é, portanto, de 50 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 6009) 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 nº 0040 e 0050).

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

## 8 Valores de referência

Noradrenalina:	até 570 nmol/24h (97 µg/24h)
Adrenalina:	até 150 nmol/L/24h (27 µg/24h)
Dopamina:	até 3240 nmol/L/24h (500 µg/24h)

Fonte: L. Thomas, Labor und Diagnose, 5. Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2000).

## 9 Fatores de conversão

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

## 10 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:**

<b>Produto</b>	<b>Armazenamento</b>
Fase Móvel	+18 a +30° C
Padrão de Calibração	+2 a +8° C
Padrão de Calibração em Urina	< -18° C
Padrão Interno	+2 a +8° C
Tampão de Neutralização	+18 a +30° C
Tampão de Eluição	+18 a +30° C
Colunas de limpeza de amostra	+18 a +30° C
Controles em urina nível I e II	+2 a +8 °C

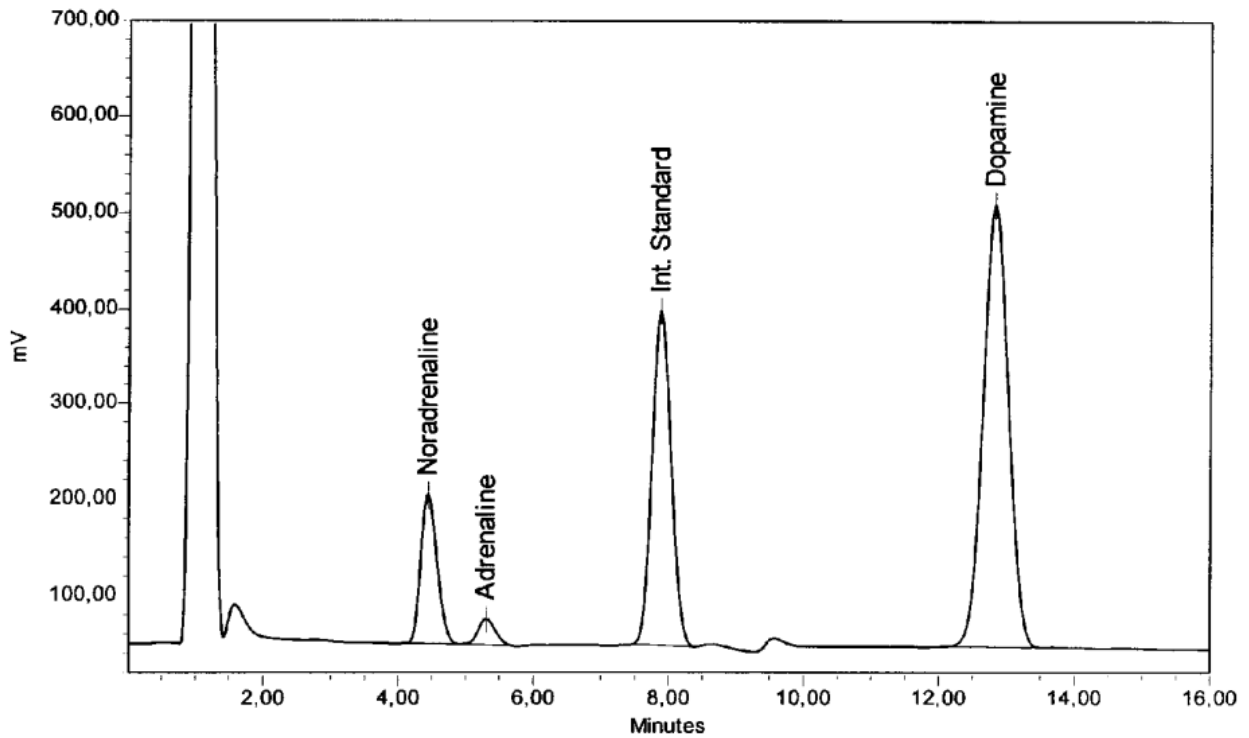
Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido estabelecido anteriormente, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles,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

## 11 Descarte de resíduos

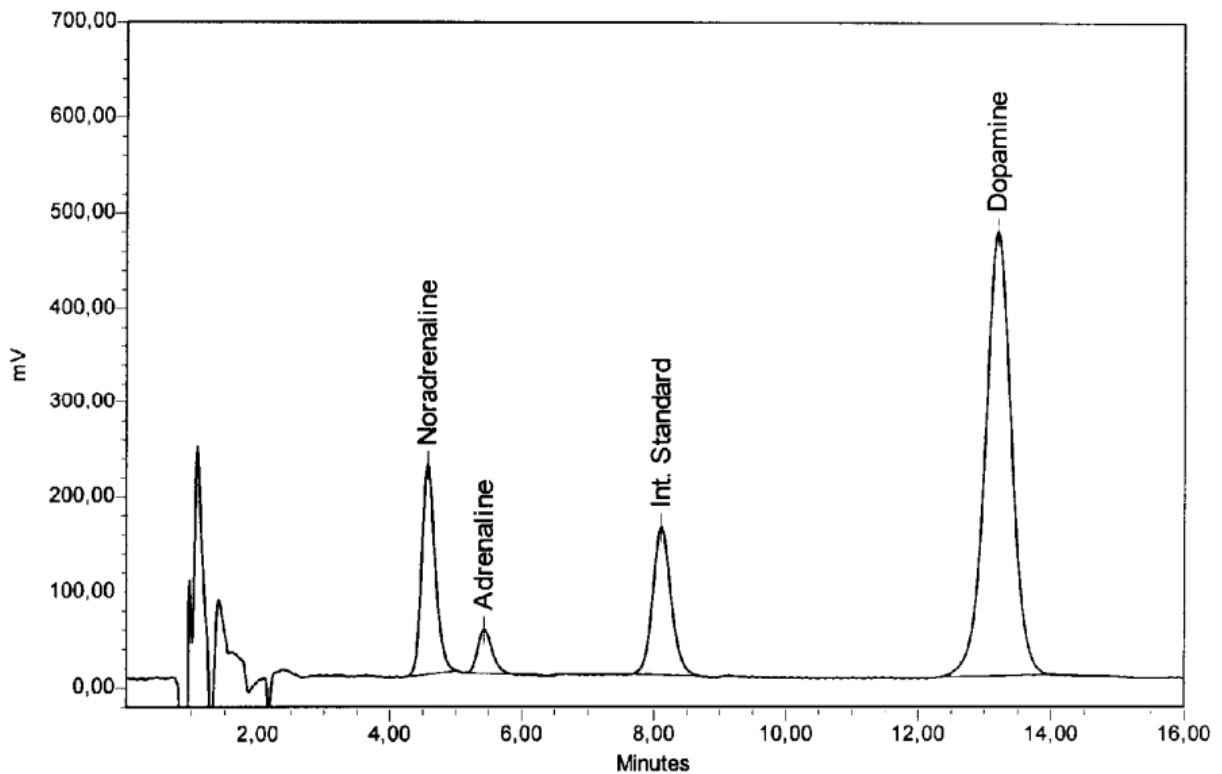
A Fase Móvel e resíduos dos espécimes preparados contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. Estes produtos não devem ser descartados juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com as diretrizes 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

## 12 Exemplos de cromatogramas

### 12.1 Cromatograma de um padrão de calibração aquoso



### 12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



## 13 Problemas e Soluções

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

Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura ambiente	<p> muito baixo, acionar o serviço técnico</p> <p>Garantir uma temperatura ambiente constante para a coluna; coluna do termostato</p>
	Fluxo irregular	Meça a taxa de fluxo. Se o fluxo da bomba estiver irregular, verifique se há bolhas de ar no sistema; ligue para a assistência técnica se necessário
Picos duplos	Volume morto na entrada da coluna	Substituir a coluna
	Volume morto na coluna de HPLC	Substituir a coluna
	Volume morto no sistema de injeção	Verificar <i>loop</i> de injeção e falhas em peças do sistema
Presença de picos interferentes	Sistema de injeção contaminado	Lavar o sistema de injeção com água, seguido de isopropanol; para a limpeza de injetores manuais, girar a válvula frequentemente durante a limpeza. Na limpeza de amostrador automático, ativar o processo de injeção várias vezes, seguindo a orientação contida no manual do equipamento
	Seringa de injeção contaminada	Lavar a seringa com isopropanol e água; lavar com ácido nítrico 15-20% se necessário
	Sistema contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Procedimento de peroxidação passiva com ácido nítrico, incluindo bomba, tubulações e sistema de injeção
	Coluna contaminada	Substituir a coluna
	Peças de material inadequado no sistema de injeção	As vedações do rotor nas válvulas de injeção são geralmente feitas de Vespel®, que pode lixiviar com o tempo, causando picos de artefatos. Geralmente, vedações de rotor feitas de Tefzel® devem ser usadas
Picos com ombros	Volume morto no sistema	Checar as conexões dos capilares para fixação correta
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, então com isopropanol e novamente com água

## 14 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, Pheocromocytoma: 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 pheocromocytoma: an unrecognized entity? Classification of pheocromocytomas according to their type of secretion, Surgery 6, 1154-1162 (1986).
6. Thomas L, Labor und Diagnose. 5<sup>th</sup> Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2000).
7. Ratge D, Baumgardt G, Knoll E, Wisser H, Plasma free and conjugated catecholamines in diagnosis and localization of pheocromocytoma, Clin Chem Acta, 132:229-243 (1983).
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. Plasma catecholamines and diabetes mellitus. *Diabetologia* 16(4): 211-14. (1984).
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, PlasmaCatecholamin-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. (1986).
18. Wind P, 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-Dahmfeld 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).

## Apêndice I: Preparo automatizado das amostras com Gilson ASPEC™

### ASPEC™\_Racks

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

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

Configurando as estantes:

Reagente	Estante	Posição
Amostras	Estante de amostras	1-52
Vials vazios	Estante de amostras	55-106 (mesmos números das amostras)
5 M HCl	Estante de amostras	107
Padrão Interno (6004/A)	Estante de amostras	108
Tampão de Neutralização (6008/A)	Estante de solventes	109
Tampão de Eluição (6006/A)	Estante de solventes	110
Colunas de preparação de amostras (6007/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 (6004/A)	55 µl
Tampão de Neutralização (6008/A)	2.75 ml
Tampão de Eluição (6006/A)	2.2 ml
5 M HCl	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.

### Princípio dos arquivos de trabalho do ASPEC™

O ASPEC™ mistura 660µl de cada espécimen de urina com 55µl de Padrão interno em um novo vial vazio, e adiciona tampão de neutralização para diluição e ajuste 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) e os eluatos obtidos são automaticamente acidificados pelo ASPEC™. As amostras preparadas estão prontas para injeção no sistema de HPLC.

### **O disco de arquivos de trabalho contém 2 arquivos:**

#### **“CATU\_NI”:**

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

#### **“CATU”:**

ASPEC™ deve ser adequadamente conectado ao sistema de HPLC! Este arquivo controla o preparo completo de amostras para catecolaminas 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; isto pode ser alterado na etapa #15 – INJECT.

**A etapa #18- 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.**

**Nota:** Amostras com baixa recuperação de catecolaminas (o pico do padrão interno é significativamente menor do que no padrão de calibração) foram preparadas a partir de urina muito ácida. Estes espécimes devem ser **diluídos com água destilada** (ou o pH da urina deve ser aumentado manualmente) e reanalisada.

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

Produto	Risco
Fase Móvel (artigo 5001/5002)   	Perigo  H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode causar danos aos órgãos.  P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.
Padrão de Calibração (artigo 6003)  	Perigo  H290 Pode ser corrosivo a metais.
Padrão Interno (artigos 6004, 6004/A1, 6004/A5)  	Perigo  H290 Pode ser corrosivo a metais.
<b>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:</b> Padrão de calibração em urina (artigos 6009, 6009/T) Tampão de neutralização (artigos 6055, 6008/A1, 6008/A5) Tampão de eluição (artigos 6006, 6006/A9) Controles endócrinos em urina (artigos 0040, 0050) Solução KCI 3M (artigo 41239)	

## Apêndice III: Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra =  $A_{\text{Amostra}}$

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

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra =  $IS_{\text{Amostra}}$

Área/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

### Linearidade e limite de quantificação

Para checar a linearidade e validar o método, amostras de urinas foram selecionadas com quantidades definidas de noradrenalina, adrenalina e dopamina. Alíquotas múltiplas dessas preparações foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra.

### Recuperação

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

Substância analisada	Recuperação [%]
Noradrenalina	80
Adrenalina	68
Dopamina	91
Padrão Interno (DHBA)	81

### Linearidade / Limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação designado até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação [µg/l] aprox. *	Faixa linear de até pelo menos [µg/l]
Noradrenalina	2,5	1450
Adrenalina	1,6	1800
Dopamina	3,6	2200

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

### Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n=10) da determinação das concentrações dos analitos da mesma espécie em 3 concentrações diferentes.

Pool de urina: valores normais.

Substância analisada	Coeficiente de variação [%] (concentração µg/L)		
	n=10	n=10	n=10
Noradrenalina	1,2 (61,1)	1,7 (202)	1,2 (134)
Adrenalina	2,9 (11,7)	1,8 (47,9)	2,1 (30,5)
Dopamina	0,8 (193)	2,2 (453)	1,2 (326)

### Precisão inter-ensaio

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

Analito	Coeficiente de variação [%] (concentração µg/L)	
	n=80	n=80
Noradrenalina	2,5 (61,7)	3,1 (204)
Adrenalina	4,1 (11,9)	3,2 (49,8)
Dopamina	3,9 (192)	3,3 (450)

## Apêndice V: Declaração de Conformidade

**CHROMSYSTEMS**  
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

COPY

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

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH  
Am Haag 12  
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: Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine  
Nomenclature code: 12-06-30-01-00  
Classification: other product

Product name: **Catecholamines 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    Telefon: +49 89 18930-0  
Telefax: +49 89 18930-199    mail: info@chromsystems.de  
www.chromsystems.de     Certifiziert nach DIN EN ISO 9001,  
DIN EN ISO 13485, ISO 13485 GMBH