

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Importado e distribuído por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói-RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
MS – nº 10350840114
SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

CATECOLAMINAS NA URINA (HPLC)

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

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

SUMÁRIO

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

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

A técnica de detecção 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 terceiro eletrodo que atua na manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente elétrica no eletrodo de referência. O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado entre o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. Qualquer substância ativa eletroquimicamente 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 determinado potencial de trabalho, a detecção eletroquímica é caracterizada por sua alta sensibilidade e sua elevada seletividade.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de metanol em solução acetato e ácido cítrico	1000 mL
Padrão de Calibração de Catecolaminas (líq.) (Calibration Standard)	Solução de HCl contendo noradrenalina, adrenalina, dopamina e DHBA	1 x 10 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução de HCl contendo DHBA (1,5µg/L)	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Tampão fosfato sódico	2 x 300 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Solução aquosa de ácido bórico	2 x 300 mL
Colunas de preparação (Sample Clean Up Columns)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

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

A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados durante a análise:

Artigo	Produto	Armazenamento
5001	Fase móvel	2 – 30°C
6003	Padrão de Calibração de Catecolaminas (líquido)	2 – 8 °C
6004	Padrão Interno	2 – 8 °C
6055	Tampão de Neutralização	2 – 30 °C
6006	Tampão de Eluição	2 – 30 °C
6009	Padrão de Calibração em Urina (liof.)	< - 18°C
0040	Controle Endócrino em Urina, Nível Normal	2 – 8 °C
0050	Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico	2 – 8 °C
6007	Colunas de preparação	2 – 30 °C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

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

GARANTIA

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

DESCARTE

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

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronta para uso.

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

Padrão Interno: pronto para uso.

Tampão de Neutralização: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

Padrão de Calibração de Catecolaminas em Urina (liofilizado):

O calibrador em urina (artigo 6009) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras. O calibrador preparado é utilizado para calibrar o sistema. **Para reconstituir o calibrador liofilizado, pipetar exatamente 10,0 mL de água tipo I no frasco. Deixar**

repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição.

Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo, evitar a exposição direta à luz. O calibrador reconstituído é estável por 2 dias se protegido da luz e mantido refrigerado entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 2 meses), conservar a - 20 °C. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Controle Endócrino em Urina, Nível Normal e Patológico:

Os controles em urina (artigo 0040 e 0050) são submetidos a todo o processo de preparo das amostras, do mesmo modo que as amostras de pacientes. Os controles são incluídos em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir o controle liofilizado, pipetar exatamente 8,0 mL de água tipo I no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo e evitar a exposição direta à luz. O controle reconstituído é estável por 5 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 3 meses), conservar a - 20 °C. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 6100).
Padrão de Calibração de Catecolaminas em Urina, liofilizado (Chromsystems art. 6009).
Controle Endócrino em Urina, Nível Normal (Chromsystems art.0040).
Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico (Chromsystems art. 0050)
Água tipo I ou grau HPLC.
Metanol grau HPLC.
HCl.
NaOH.
Centrífuga.
Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Deverão ser analisadas, preferencialmente, amostras de urina de 24 horas coletadas em recipientes contendo 10 mL de HCl 25%.

Estabilidade da amostra: as amostras coletadas desta forma são estáveis por 5 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): as amostras preparadas são estáveis por até 48 horas entre 2 a 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20 °C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20µL, tempo de corrida 15 min.
Detector eletroquímico: +400 a +500mV
Fluxo: 0,8 a 1,3 mL/min
Tempo de corrida: 15 min

Procedimento de preparo de amostras:

Etapa de Estabilização e Pré-diluição:

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

Etapa de Extração e Lavagem:

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

Etapa de Eluição:

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

Tempo de retenção esperado:

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

CÁLCULOS

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

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = Aamostra

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = ACalibrador

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = ISAmostra

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = ISCalibrador

Concentração C do analito A no calibrador = *CCalibrador

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

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

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

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

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

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

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

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

Fatores de conversão:

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

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

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

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Faixa de Medição:

O método é considerado linear para todas as catecolaminas em concentrações que variam de 3 a 1000 µg/L de urina.

Recuperação:

As taxas de recuperação absoluta e analítica, corrigida pelo padrão interno, estão na tabela seguinte:

Analito	Recuperação absoluta	Recuperação analítica
Noradrenalina	81%	103%
Adrenalina	69%	87%
Padrão Interno	73%	-
Dopamina	79%	92%

Precisão:

Precisão intra-ensaio n = 10	Coefficiente de variação (%) / Concentração (µg/L)
Noradrenalina	1,5% / 70,1 µg/L
Adrenalina	2,4% / 15,2 µg/L
Dopamina	4,9% / 219,1 µg/L

Precisão inter-ensaio n = 10	Coefficiente de variação (%) / Concentração (µg/L)
Noradrenalina	1,6% / 68,4 µg/L
Adrenalina	4,9% / 16,3 µg/L
Dopamina	6,0% / 222,1 µg/L

VALORES DE REFERÊNCIA

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

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

LITERATURA

- Cooper JR, Bloom RH, The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 5th Edition, New York, Oxford University Press (1986).
- Wisser H, Knoll E, Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag Stuttgart (Hsrg. H. Greiling und AM Gressner) (1987).
- Bravo EL, Gifford RW, Pheocromocytoma: Diagnosis, Localization and Management, N Engl. J Med. 311:1298-1303 (1984).
- Bravo EL, The Clinical Value of Catecholamine Measurement, Laboratory Management (Jun 1982).
- Proye C, Fossati P, Fontaine P, Lefebvre J, 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).
- Thomas L, Labor und Diagnose. 5th Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2000).
- Ratge D, Baumgardt G, Knoll E, Wisser H, Plasma free and conjugated catecholamines in diagnosis and localization of pheocromocytoma, Clin Chem Acta, 132:229-243 (1983).
- Grobecker H, Saavedra JM, Dominiak P, Catecholamines in experimental and essential hypertension. In: The Heart in Hypertension, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 109-121 (1981).
- P Hjemdahl, Plasma catecholamines as makers for sympathoadrenal activity in man, Acta Physiol Scand. 1984, Suppl. 527:7-9.
- Christensen NJ, Catecholamines and Diabetes Mellitus, Diabetologia, 16:211 (1979).
- Lake CR, Sternberg DE, Van Kammen DP, Ballenger JC, Ziegler MG, Post RM, Kopin IJ, Bunney WE, Schizophrenia: Elevated Cerebrospinal Fluid Norepinephrine, Science 207:311 (1980).
- Borg S, Kvande H, Sedvall G, Central Norepinephrine Metabolism During Alcohol Intoxication in Addicts and Healthy Volunteers, Science 213:1135 (1981).
- Kauert G, Schoppek B, Clarmann VM, Hibler A, PlasmaKatecholamin-Verlauf bei Alkylphosphat-Intoxikationen und deren Therapie, Klin Wochenschr. 67:456-462 (1989).
- Darwish R, Elias AN, Plasma and Urinary Catecholamines and their Metabolites in chronic renal failure, Arch Intern Med. Vol 114, Jan 1984.
- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure, N Engl. J Med. 311:819-823 (1984).
- Goldstein DS, Plasma Catecholamines in Clinical Studies of Cardiovascular Diseases, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:39-41 (1984).
- Elworthy PM, Hitchcock ER, Estimation of plasma catecholamines by HPLC with ECD in patients with subarachnoid hemorrhage.
- Wind P, Causon RC, Brown MJ, Barnes PJ, Circulating Catecholamines in Acute Asthma, British Medical Journal, Volume 20 (1985).
- Halter JB, Stratton JR, Pfeifer MA, Plasma catecholamines in hemodynamic responses to stress states in man, Acta Physiol Scand, Suppl. 527:31-38 (1984).
- 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).
- Weicker H, Determination of free and sulfoconjugated catecholamines in plasma and urine by HPLC, Int J Sports Med. 9: 68-74 Suppl. (1988).
- Pluto R, Bürger P, Normal values of catecholamines in blood plasma determined by HPLC with amperometric detection, Int J Sports Med. 9: 75-78 Suppl. (1988).

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