

## CATECHOLAMINES IN PLASMA HPLC

## CATECOLAMINAS EM PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Catecolaminas em Plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
5000	Kit Reagente para Análise de Catecolaminas em Plasma (200 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para análise de Catecolaminas em plasma por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

## SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análise de adrenalina, noradrenalina e dopamina em plasma 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 no plasma 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 plasmáticas também é útil no diagnóstico diferencial de hipertensão e na avaliação da insuficiência cardíaca congestiva, doenças coronarianas, *diabetes mellitus*, arteriosclerose e asma aguda. Os níveis de catecolaminas também fornecem informações úteis em questões científicas nas pesquisas sobre estresse e na medicina esportiva.

## MÉTODO

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

## PRINCÍPIO

Este kit de reagentes foi desenvolvido para uma determinação em rotina confiável de adrenalina, noradrenalina e dopamina em plasma. Antes da análise no HPLC, os analitos são extraídos da matriz de plasma por adsorção em alumina. O preparo de amostras é simples, uma vez que não é necessário ajustar o pH das amostras de plasma. Além disso, o preparo de amostras requer somente etapas de lavagem com o Tampão de Lavagem.

Uma coluna dedicada de HPLC em combinação com a fase móvel, otimizada para esta separação em particular, permite uma quantificação cromatográfica segura e confiável.

## REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de metanol, acetato de sódio e ácido cítrico	1 x 1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de HCl contendo sal sódico de DHBA	1 x 10 mL
Padrão de calibração (aquoso)	Solução aquosa de HCl com sais sódicos de de noradrenalina, adrenalina, dopamina e DHBA	1 x 10 mL
Tampão de Extração	Solução de trometamol e HCl	1 x 100 mL

(Extraction Buffer)		
Tampão de Lavagem (Wash Buffer)	Solução aquosa contendo HCl	2 x 300 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Tampão de acetato de sódio e ácido acético	1 x 25 mL
Colunas de preparação (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício (modificado)	4 x 50 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 as temperaturas de armazenagem para os reagentes do kit:

Artigo	Produto	Armazenamento
5001	Fase móvel	18 – 30°C
5003	Padrão de Calibração de Catecolaminas (aquoso)	2 – 8 °C
5004	Padrão Interno	2 – 8 °C
5011	Tampão de Extração	18 – 30°C
5005	Tampão de Lavagem	18 – 30°C
5006	Tampão de Eluição	18 – 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. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livre de halogênio. O Padrão Interno e o Padrão de Calibração são soluções ácidas, o Tampão de Extração e os resíduos dos espécimes preparados contêm um sal classificado como perigoso. Neutralize estas soluções e descarte-as em um contêiner para soluções salinas. Elas não devem ser eliminadas juntamente com os resíduos domésticos. O descarte deve ser feito de acordo com as exigências locais.

## PREPARO DOS REAGENTES

**Fase Móvel:** pronta para uso.

**Padrão de Calibração (aquoso):** pronto para uso.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

**Tampão de Extração:** pronto para uso.

**Tampão de Lavagem:** pronto para uso.

**Tampão de Eluição:** pronto para uso.

## MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 5100).  
Padrão de Calibração de Catecolaminas em Plasma, liofilizado (Chromsystems art. 5009).

Controle Endócrino em Plasma, Nível Normal (Chromsystems art. 0010).

Controle Endócrino em Plasma, Nível Patológico (Chromsystems art.0020)

Centrífuga.

Água tipo I ou grau HPLC.

Metanol grau HPLC.

Material geral de laboratório.

## AMOSTRA

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 glutatona para a estabilização das amostras dos pacientes [23]. O seguinte procedimento pode ser utilizado:

Para cada mL de sangue coletado, deverá ser adicionado 20µL da seguinte solução estabilizante: 144 mg/ml de EGTA (Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiléter-N,N,N,N-tetracético) e 72 mg/ml de glutatona 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 centrifugue o sangue preparado.

**Estabilidade da amostra:** 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 [24]. Se as amostras forem estabilizadas por glutatona, elas serão estáveis por seis meses a -20°C [23].

**Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):** As catecolaminas, em tampão de eluição, são estáveis por até 5 dias em +2° a +8°C. Para as dopaminas, a estabilidade foi verificada em até 2 dias de armazenamento. Para períodos maiores de armazenamento, colocar as amostras no freezer (-18°C).

## PROCEDIMENTOS DO TESTE

### Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20 a 50µL, tempo de corrida 20 min.

Detector eletroquímico: +400 a +500mV

Fluxo: 0,8 a 1,3 mL/min

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

### Procedimento de preparo de 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 1,0-1,5 mL de plasma e 50 µL de Padrão Interno.
3. Tampe a parte superior da coluna de extração e agite-a, por inversão, durante 10 minutos.

4. 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 lavagem:

Adicione 1 mL do Tampão de Lavagem e agite a coluna por alguns segundos. Remova o sobrenadante por vácuo ou através de centrifugação (1 min a 700 x g).

**Repita este procedimento por mais 2 vezes.** Após a terceira e última etapa de lavagem, centrifugue a coluna por 2 minutos a 2800 x g.

#### Eluição:

1. Adapte um tubo plástico na saída da coluna. Adicione 120 µL de solução tampão de eluição e agite a coluna por alguns segundos. Aguarde 5 minutos em repouso e depois agite em vortex por 30 seg.
2. Centrifugue por 1 minuto a 700 x g, recolhendo o eluato no tubo acoplado.
3. Misture a amostra eluída da coluna.

#### Análise por HPLC:

Injete de 20 - 50 µL da amostra eluída.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos (1mL/min)
Noradrenalina	5.5
Adrenalina	7.0
Padrão Interno	11.0
Dopamina	17.0

## CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A<sub>amostra</sub>

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = Calibrador

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS<sub>amostra</sub>

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS<sub>calibrador</sub>

Concentração C do analito A no calibrador = \*C<sub>calibrador</sub>

\*Concentrações do calibrador aquoso (artigo 5003):

Analito	Tempo de retenção (aprox. min)	Concentração (ng/L)
Noradrenalina	5.5	600
Adrenalina	7	300
Padrão Interno	11	1
Dopamina	17	300

Os valores acima devem ser aplicados em amostras analisadas de 1 mL de plasma. Se um volume maior de plasma (1,5 mL) for utilizado na preparação da amostra, os cálculos deverão ser refeitos e tal valor deverá ser considerado na avaliação quantitativa.

\*Concentrações do calibrador em plasma liofilizado (artigo 5009):

Utilizar os valores que constam no folheto de informações que acompanha o produto.

Fatores de conversão:

Analito	ng/l para pmol/l	pmol/l para ng/l
Noradrenalina	x 5.9102	x 0.1692
Adrenalina	x 5.4585	x 0.1832
Dopamina	x 6.5274	x 0.1532

## CALIBRADORES E CONTROLES

Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
5009	Padrão de Calibração de Catecolaminas em Plasma (liofilizado)	10 x 2,5mL
0010	Controle Endócrino em Plasma, Nível Normal	10 x 5 mL
0020	Controle Endócrino em Plasma, Nível Patológico	10 x 5 mL

### DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

#### Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação (ng/L)*	Limite máximo (ng/L)
Noradrenalina	43	2000
Adrenalina	18	1000
Dopamina	81	1000

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

#### Recuperação:

Analito	Recuperação [%]
Noradrenalina	74
Adrenalina	71
Dopamina	40
Padrão Interno (DHBA)	66

#### Precisão intra-ensaio:

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:

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)

### VALORES DE REFERÊNCIA

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

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, 5<sup>th</sup> 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, Decoux 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. 8<sup>th</sup> Edition, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (2012).
- 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, PlasmaCatecholamin-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.
- Ind PW, 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).
- 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).
- 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.

## Símbolos Usados



Fabricante



Limites de temperatura



Diagnóstico in vitro



Cuidado, consulte documentos anexos



Consulte instruções de uso



Material Reciclável



Não rejeitar diretamente para o ambiente



Lote



Data de Fabricação



Validade



Risco Biológico



Altamente tóxico



Corrosivo



Nocivo

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 10350840141

SAC: [sac@biosys.com.br](mailto:sac@biosys.com.br) – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)