

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

BIOGENE AMINE
BIOGENIC AMINES
AMINES BIOGÈNES
AMMINE BIOGENE
AMINAS BIÓGENAS



Manual de Instruções para Análise por HPLC de Serotonina em Soro/ Plasma e Sangue Total

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Serotonina em soro/plasma/sangue total por HPLC.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 3030

SEROTONINA EM SORO/ PLASMA/ SANGUE TOTAL POR HPLC MS 10350840120

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	2
1 Informações gerais	3
2 Introdução	4
3 Teoria da detecção eletroquímica	5
3.1 Princípios gerais	5
3.2 Influência do potencial de trabalho na sensibilidade da detecção eletroquímica.....	5
3.3 Otimização do potencial de trabalho	6
4 Sistema de HPLC	7
4.1 Instalando o equipamento.....	7
4.2 Parâmetros cromatográficos	7
4.3 Coluna cromatográfica	8
4.4 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC.....	8
4.4.1 Bomba e tubulações	8
4.4.2 Eletrodo de trabalho (“Ativação”)	9
4.4.3 Eletrodo de referência	9
4.4.4 Evitando flutuações de fluxo da bomba.....	10
4.4.5 Desligando o equipamento.....	10
5. Preparo da amostra.....	10
5.1 Coleta e armazenamento das amostras	10
5.2 Reconstituição do padrão de calibração em soro	11
5.3 Reconstituição dos controles.....	11
5.4 Procedimento de preparo das amostras em soro	12
5.5 Preparo da amostra de plasma (pobre em plaquetas)	12
5.6 Preparo da amostra de sangue total	12
5.7 Estabilidade das amostras preparadas	12
6 Resultados e avaliação	13
6.1 Calibração do sistema de análise.....	13
6.2 Avaliação quantitativa com Padrão Interno	13
7 Controle de Qualidade	14
8 Valores de referência	14
9 Fatores de conversão.....	15
10 Armazenamento e validade dos reagentes	15
11 Descarte de resíduos.....	15
12 Exemplos de cromatogramas	16
12.1 Cromatograma de um padrão de calibração em soro.....	16
12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente.....	16
13 Problemas e Soluções.....	17
14 Literatura.....	19
15 Agradecimentos	19
Apêndice I: Informações de segurança	20
Apêndice II: Cálculo manual	21
Apêndice III: Validação	22
Apêndice IV: Declaração de Conformidade	23

1 Informações gerais

Nº do artigo	Produto	
3030	Kit de reagentes para análise por HPLC de Serotonina em soro, plasma e sangue total, para 100 análises.	
	Componentes do Kit:	
	Fase móvel	1000 ml
	Padrão Interno	10 ml
	Reagente de Precipitação	10 ml
	Tubos de reação	100 unidades
	Componentes disponíveis separadamente:	
3031	Fase móvel	1000 ml
3032	Fase móvel	10 x 1000 ml
3033	Padrão de calibração	10 ml
3009	Padrão de calibração liofilizado em soro	5 x 1,0 ml
3034	Padrão Interno	10 ml
3035	Reagente de Precipitação	10 ml
3006	Tubos de Reação	100 unidades
	Acessórios	
3130	Coluna para HPLC. (Equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
15009	Pré-filtros PEEK	5 peças
15010	Pré-filtro PEEK <i>housing</i>	1 peça
	Controles (liofilizados)	
0010	Controle endócrino em plasma, nível normal	10 x 5 ml
0020	Controle endócrino em plasma, nível patológico	10 x 5 ml
	Acessórios para detetores eletroquímicos da Chromsystems, Merck, Pharmacia e Waters (M460)	
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

A serotonina (5-hidroxitriptamina) ocorre frequentemente em plantas e animais. Em humanos, a serotonina é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico, onde age como vasoconstritor. Apesar de somente 1% do conteúdo da serotonina no corpo inteiro ser encontrada no sistema nervoso central, neurônios serotoninérgicos são o centro de vários processos, como controle da pressão arterial, sono, regulação térmica, comportamento de bebida e comida e memória (2,3). A medição da concentração da serotonina do fluido cerebrospinal, entretanto, tem demonstrado não refletir o processo que ocorre no cérebro.

A serotonina é encontrada principalmente nas células cromafins do trato gastrointestinal onde faz parte do sistema de hormônios gastrointestinal. Quando liberada no sangue, a serotonina é absorvida quase completamente pelos trombócitos (aproximadamente 97% da serotonina total) (1). Devido a esse sistema de captação muito efetivo, os trombócitos são usados como modelo de sistema neurofarmacológico de inibidores de receptação de serotonina.

Um número de doenças é acompanhado das mudanças no metabolismo da serotonina (4,5). A mais importante destas na rotina de química clínica é relacionada com a determinação de serotonina no diagnóstico de síndrome carcinóide. A síndrome carcinóide é um tumor produtor de hormônio que ocorre principalmente no trato gastrointestinal responsável por 8% dos tumores malignos no intestino delgado, e 0,3% no estômago e largo grosso. Também ocorre nos bronquíolos (0,6% malignos), fígado e ovários (1%) (6-8). Apesar de vários hormônios terem sido detectados em casos de síndrome carcinóide, 45% dos carcinóides de cólon investigados foram positivos para serotonina. Os hormônios secretados pelo tumor são responsáveis pelos sintomas da síndrome carcinóide, mais frequentemente calores, cólicas, diarreia, úlcera péptica, ileus incompleto intermitente crônico, e falta de ar.

Hoje a determinação da serotonina ou de seu metabólito 5-HIAA pertence aos testes diagnósticos padrões quando síndrome carcinóide for suspeita. Os métodos por HPLC para determinação de serotonina em soro, plasma e urina estão cada vez mais importantes desde que a técnica analítica satisfaça a demanda por sensibilidade e especificidade. A Chromsystems agora simplificou ainda mais a determinação HPLC da serotonina em material biológico. O Kit Chromsystems com reagentes prontos para uso contém todos os itens necessários para um preparo rápida da amostra como a análise HPLC. Uma separação cromatográfica otimizada é parte da solução completa que permite a quantificação segura e confiável por HPLC.

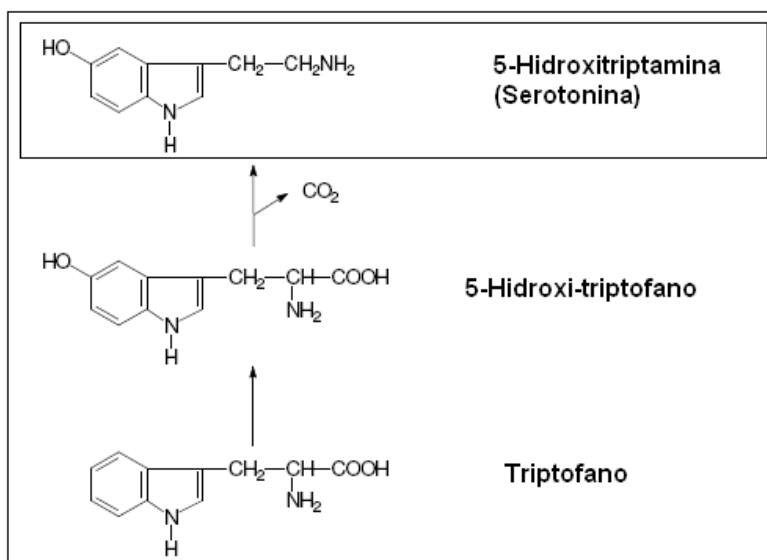


Figura 1 – Biossíntese da serotonina

Uso pretendido:

O kit de reagentes de Serotonina em soro/plasma/sangue total da Chromsystems é uma ferramenta de diagnóstico in vitro designada para ser usada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de serotonina em amostras de sangue de pacientes com o uso de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção eletroquímica. Foi desenvolvido como teste de monitoramento para pacientes com suspeita de tumores secretores de serotonina.

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 oxidado ou reduzido. As transformações por oxidação ou redução de tal substância geram uma perda ou ganho de elétrons, resultando em uma corrente elétrica que pode ser detectada e medida pelo instrumento, amplificada e registrada como um sinal cromatográfico.

Uma vez que somente um número limitado de grupos funcionais e estruturas químicas são susceptíveis a processos de oxi-redução, em um específico potencial de trabalho, a detecção eletroquímica não é apenas caracterizada por sua alta sensibilidade, mas também por sua elevada seletividade.

3.2 Influência do potencial de trabalho na sensibilidade da 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.

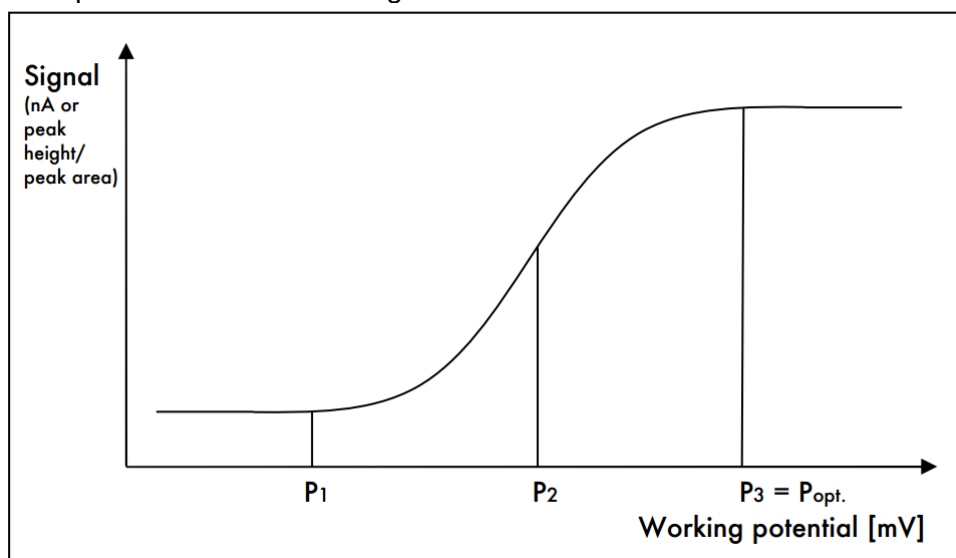


Figura 2 – Correlação entre potencial de trabalho e detector de sinal.

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

Um potencial de trabalho correto é muito importante para a seletividade da análise eletroquímica e, também, tem que ser otimizado periodicamente para garantir a sensibilidade máxima com mínima interferência.

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, avalia-se a área ou a altura do pico do padrão interno dihidroxibenzilamina (DHBA) em solução aquosa padrão (artigo 3033), uma vez que sua transformação eletroquímica requer o maior potencial de trabalho. Para tanto, o seguinte procedimento é recomendado:

1. Ajuste o potencial de trabalho em +360mV e injete o padrão de calibração (artigo 3033). 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 3033) 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. Mantenha este cromatograma como referência.

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.

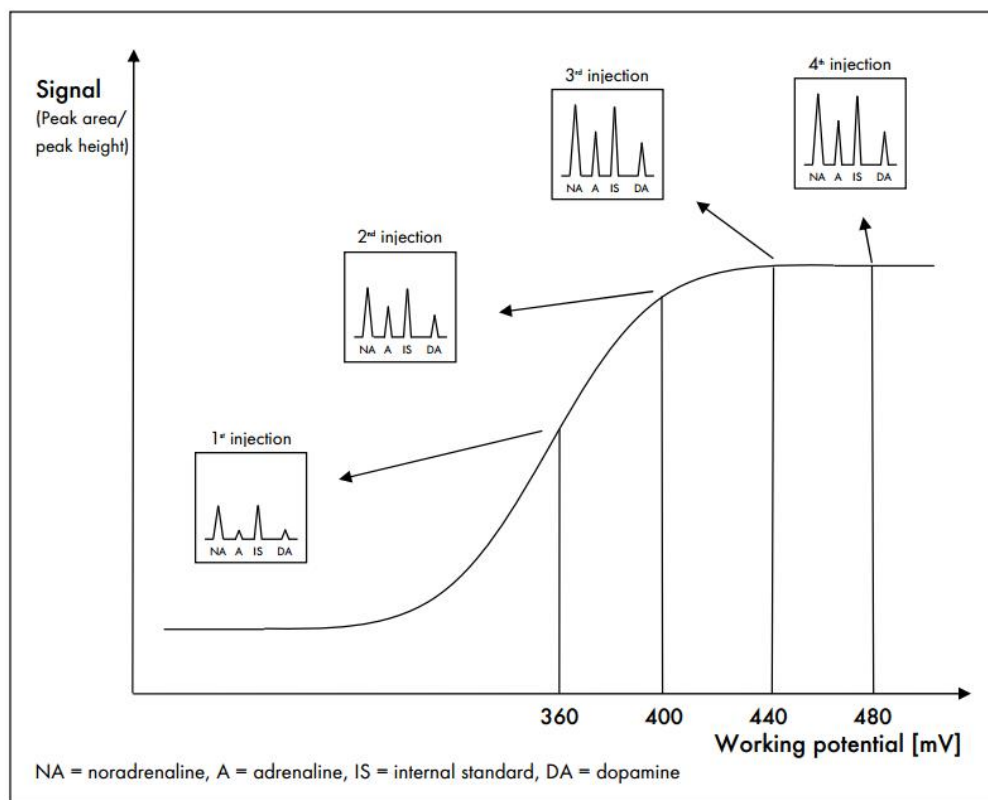


Figura 3 – Otimização do potencial de trabalho

4 Sistema de HPLC

Atenção: Antes de utilizar os reagentes do Kit, favor verificar as informações de segurança contidas Apêndice I 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).

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 3.3). Para a detecção de serotonina 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. Razão do fluxo: 1,0 - 1,2 mL/min.
2. Temperatura da coluna: temperatura ambiente (aproximadamente 25°C)

A separação cromatográfica pode ser conduzida em temperatura ambiente, mas a temperatura deve ser mantida o mais constante possível. Se necessário ajuste a razão do fluxo ou use uma pré-coluna. O tempo total da corrida é de 9 minutos (ver cromatograma posterior). As variações dos tempos de retenção são de $\pm 10\%$ dependendo da temperatura, razão do fluxo, tempo de uso da fase móvel e coluna.

Analito	Tempo de retenção (aprox. em min) (razão de fluxo de 1,0mL/min)
Serotonina	5,0
Padrão interno	6,5

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 soro. Para tanto, uma alíquota do padrão de calibração é injetada repetidamente no sistema de HPLC. Os parâmetros de integração podem estabelecer corretamente a base do cromatograma obtido. A última injeção pode ser usada para calibração.

4.3 Coluna cromatográfica

A coluna para HPLC, utilizada na análise das serotoninas, 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 90 bar (1300 psi). Este valor de pressão pode aumentar com a idade da coluna ou com o uso. Uma vez que a separação cromatográfica seja satisfatória, variações da pressão da coluna são irrelevantes, desde que não excedam 200 bar (3000 psi). Para aumentar a vida útil da coluna deve ser usado um pré-filtro (artigo 15009 e 15010).

4.4 Cuidados e manutenção do sistema de HPLC**4.4.1 Bomba e tubulações**

O trabalho analítico, na faixa de sensibilidade necessária para esta análise, requer minuciosa limpeza da bomba e das tubulações do sistema de HPLC.

Apenas reagentes e solventes com graus apropriados de pureza devem ser utilizados. Na detecção eletroquímica, mesmo os menores traços de substâncias eletroquimicamente ativas podem levar a um aumento substancial do ruído da linha de base ou acarretar o aparecimento de picos adicionais.

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

Procedimento de peroxidação passiva:

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

Primeiramente, remova qualquer resíduo de fase móvel do sistema, principalmente no caso de tampões, deixando circular água grau HPLC por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, inicie o procedimento, bombeando uma solução aquosa de ácido nítrico 15 - 20%, com um fluxo de 1,5 mL/min, durante 20 minutos. 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.

Em seguida, remova o ácido nítrico, deixando circular água grau HPLC no sistema, por aproximadamente 20 minutos. Realize também a limpeza do sistema de injeção com água, empregando o mesmo procedimento indicado no caso da solução de ácido nítrico. De tempos em tempos, verifique o pH da água de limpeza. A limpeza só deverá ser interrompida quando o pH verificado for de mesmo valor do pH da água pura, que está sendo empregada na remoção de resíduos de ácido nítrico. A partir deste ponto, a fase móvel da análise poderá ser bombeada no sistema. Da mesma forma, a coluna analítica e o detector poderão ser novamente conectados.

4.4.2 Eletrodo de trabalho (“Ativação”)

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 sulfocrômico.

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, Pharmacia ou Waters)

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 sulfocrômico sobre a região central do eletrodo (ponto preto).
4. Aguarde de 2 - 5 minutos.
5. Lave o eletrodo com água bidestilada.
6. Recoloque o eletrodo de trabalho na célula analítica.
7. Equilibre novamente o sistema cromatográfico.

4.4.3 Eletrodo de referência

(Somente aplicável para os detectores eletroquímicos da Chromsystems, Pharmacia ou Waters)

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 de tempo sem utilizar o equipamento, seguir os procedimentos abaixo:

1. Desconectar e guardar a coluna de HPLC. Não é necessário realizar um procedimento de lavagem da coluna. Esta deverá ser armazenada na própria fase móvel em temperatura ambiente.
2. O detector deverá ser colocado no modo de *stand-by*.
3. O sistema de HPLC deverá ser lavado com no mínimo 50mL de água/metanol (1:1).
4. Os eletrodos de referência e de trabalho deverão ser removidos e lavados com água e armazenados secos para uso futuro. Marcar o lado ativo do eletrodo de trabalho.

5. Preparo da amostra

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

5.1 Coleta e armazenamento das amostras

Nota: É de responsabilidade individual do laboratório usar todos as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para definir os critérios de estabilidade do laboratório.

Normalmente são usadas para análise amostras de soro, plasma ou sangue total de pacientes que não ingeriram alimentos que contém serotonina. O sangue coletado deve ser mantido no gelo e analisado no mesmo dia da coleta, de preferência pela manhã. A serotonina está localizada principalmente nas plaquetas (97%).

Amostras de soro:

Deve-se tomar cuidado ao se destruir todas as plaquetas completamente. Somente assim a determinação da serotonina total é possível. Recomendação: para coagulação intensa por utilização de tubos com ativador de coágulos, por exemplo SARSTEDT ou GREINER, centrifugue por 10 minutos à 1500 xg.

(Fonte: DG Klinische Chemie Mitteilungen 1998; 29 (3)).

Amostras de plasma (plasma pobre em plaquetas):

Quando for usado plasma para quantificar a serotonina é essencial a obtenção de plasma livre de células sem destruir as plaquetas. Para essa proposta é necessária a adição de anticoagulante (por exemplo EDTA, heparina). Recomendação: Centrifugar por no mínimo 15 minutos à 2000 – 3000 xg. (Fonte: DG Klinische Chemie Mitteilungen 1998; 29 (3)).

Concentrado de plaquetas:

Para a separação das plaquetas use sangue total com anticoagulante (EDTA ou heparina, mesmo tubo da coleta de plasma) e centrifugue em baixa velocidade (1500 rpm) por 15 minutos. O plasma rico em plaquetas obtido é centrifugado em alta velocidade (4000 – 5000 rpm) por 5 – 10 minutos, e o concentrado de plaquetas pode ser coletado do agregado o tubo.

Nota: Se a análise for realizada dentro de 12 horas, as amostras devem ser armazenadas à 4°C. Para períodos maiores de armazenamento as amostras devem ser congeladas (-20°C).

5.2 Reconstituição do padrão de calibração em soro

O padrão de calibração (artigo 3009) é rastreável à substâncias de referência obtidas de fornecedores certificados.

Após reconstituição, o padrão de calibração deverá ser preparado de acordo com o procedimento de preparo 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 soro liofilizado, transferir exatamente 1,0 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.

Validade do padrão reconstituído:

O padrão reconstituído é estável por até 2 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 -20°C, por um período máximo de 3 meses.

5.3 Reconstituição dos controles

Depois de reconstituídos, os controles em plasma nível normal e patológico (artigo 0010 e 0020) devem ser analisados como se fossem amostras de pacientes, seguindo o mesmo procedimento analítico designado para a preparo 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 5,0 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:

Os controles contêm componentes derivados de material humano, e foram submetidos a testes de diagnóstico para hepatite B (HbsAg), hepatite C (HCV), HIV-1 e HIV-2, fornecendo resultados negativos. Entretanto, estes produtos devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes.

Validade dos controles reconstituídos:

Os controles reconstituídos são estáveis por até 2 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 aliqüotados e armazenados a -20°C, por um período máximo de 3 meses.

5.4 Procedimento de preparo das amostras em soro

- Adicionar 100 µl de soro em um frasco de reação
- Adicionar 100 µl do Padrão Interno
- Adicionar 100 µl do Reagente de Precipitação

- Misturar no vórtex por 30 segundos,
- Incubar por 10 minutos à temperatura de +2° a +8°C,
- Centrifugar 10 minutos à 16000 x g,
- Injetar 20 µL do sobrenadante no sistema HPLC.

5.5 Preparo da amostra de plasma (pobre em plaquetas)

Nota: Para determinação da serotonina em plasma é necessário diluir o padrão de calibração (artigo 3033 e 3009 assim como padrão interno (artigo 3034) na razão de 1:10 com água destilada. Na avaliação quantitativa a diluição tem que ser compensada pelo fator “10”.

- Adicionar 100 µl de soro em um frasco de reação
- Adicionar 100 µl do Padrão Interno, diluído 1:10 com água ultrapura (grau HPLC)
- Adicionar 100 µl do Reagente de Precipitação

- Misturar no vórtex por 30 segundos,
- Incubar por 10 minutos à temperatura de +2° a +8°C,
- Centrifugar 10 minutos à 16000 x g,
- Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema HPLC.

5.6 Preparo da amostra de sangue total

- Adicionar 50 µl de sangue total (em EDTA, heparina) em um frasco de reação
- Adicionar 50 µl de água ultrapura (grau HPLC)
- Adicionar 100 µl do Padrão Interno
- **Incubar a amostra por 10 minutos em temperatura ambiente!**
- Adicionar 100 µl do Reagente de Precipitação

- Misturar no vórtex por 30 segundos,
- Incubar por 10 minutos à temperatura de +2° a +8°C,
- Centrifugar 10 minutos à 16000 x g,
- Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema HPLC.

Na avaliação quantitativa, o fator de diluição “2” deve ser compensado.

5.7 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas são estáveis por 24h mantidas em temperatura ambiente. Se for utilizado um amostrador automático, as amostras devem ser analisadas dentro de 1 dia. As amostras 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 de análise

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

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

Utilizando a solução padrão de calibração (artigo 3033):

Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/L)
Serotonina	5.0	250
Padrão Interno	6.5	1

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

Utilizando o padrão de calibração em soro (artigo 3009):

Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/L ou nmol/L)
Serotonina	5.0	Ver folheto informativo
Padrão Interno	6.5	1

O padrão de calibração em soro deverá ser preparado de acordo com o procedimento de preparo das amostras, como se fosse uma amostra de paciente. Desta forma, o padrão deverá ser usado para calibrar o sistema de HPLC.

Para garantir que nem o calibrador nem as condições do HPLC (tempo de retenção, etc) tenham mudado durante a análise, o padrão preparado deve ser injetado durante a análise e novamente no final. O valor de concentração do padrão depende do lote e poderá ser encontrado no folheto de informações que acompanha o padrão.

6.2 Avaliação quantitativa 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 serotonina, o padrão interno será o pico nº 2 no cromatograma do padrão de calibração) da corrida de calibração como o padrão interno.

Concentração do padrão interno: N-Metilserotonina 0.5 ng/µl.

São adicionados 100 µl de solução padrão interno (0,5 ng/µl) em 100 µl de soro. A concentração final de padrão interno na amostra é portanto de 500 ng/ml (500 µg/l).

Composição da solução padrão de calibração (artigo 3033):

Serotonina:	100 ng/ml	(100 µg/l)
Padrão interno:	200 ng/ml	(200 µg/l)

Referindo-se a concentração de padrão interno nas amostras, as concentrações no calibrador devem ser consideradas 2,5 vezes mais alta:

Serotonina:	250 ng/ml	(250 µg/l)
Padrão interno:	500 ng/ml	(500 µg/l)

Dessa forma a concentração do padrão interno no padrão de calibração aquoso e nas amostras pode ser inserido como “1”. A concentração de serotonina no padrão de calibração aquoso é considerada como “250 ng/mL”.

Quando for utilizado o padrão de calibração liofilizado em soro (artigo 3009) a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes. Assim, a concentração do padrão interno poderá ser considerada como “1” em todas as amostras.

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

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 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.

8 Valores de referência

Nota: Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método as características da respectiva população.

Matriz	Faixa de Referência	Fonte
Soro	227 – 1135 nmol/l (40-220µg/l)	14
Plasma EDTA	284 – 1873 nmol/l (50-330µg/l)	14
Sangue total	385 – 1319 nmol/l (68-232µg/l)	15
Plasma pobre em plaquetas	0.86 - 16.96 nmol/l (0.15-2.99µg/l)	15
Plasma rico em plaquetas	2.5 – 6.1 nmol/10 ⁹ plaquetas	16
Recém-nascido (plasma rico em plaquetas)	1.67 ± 0.74 nmol/10 ⁹ plaquetas	17

9 Fatores de conversão

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

Analito	$\mu\text{g/L}$ para nmol/L	nmol/L para $\mu\text{g/L}$
Serotonina	x 5,6747	x 0,1762

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:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	Temperatura ambiente
Padrão de Calibração	+2 a +8° C
Padrão Interno	+2 a +8° C
Reagente de Precipitação	Temperatura ambiente
Padrão de Calibração em Soro	+2 a +8° C
Controles em soro, Níveis I e II	+2 a +8° C

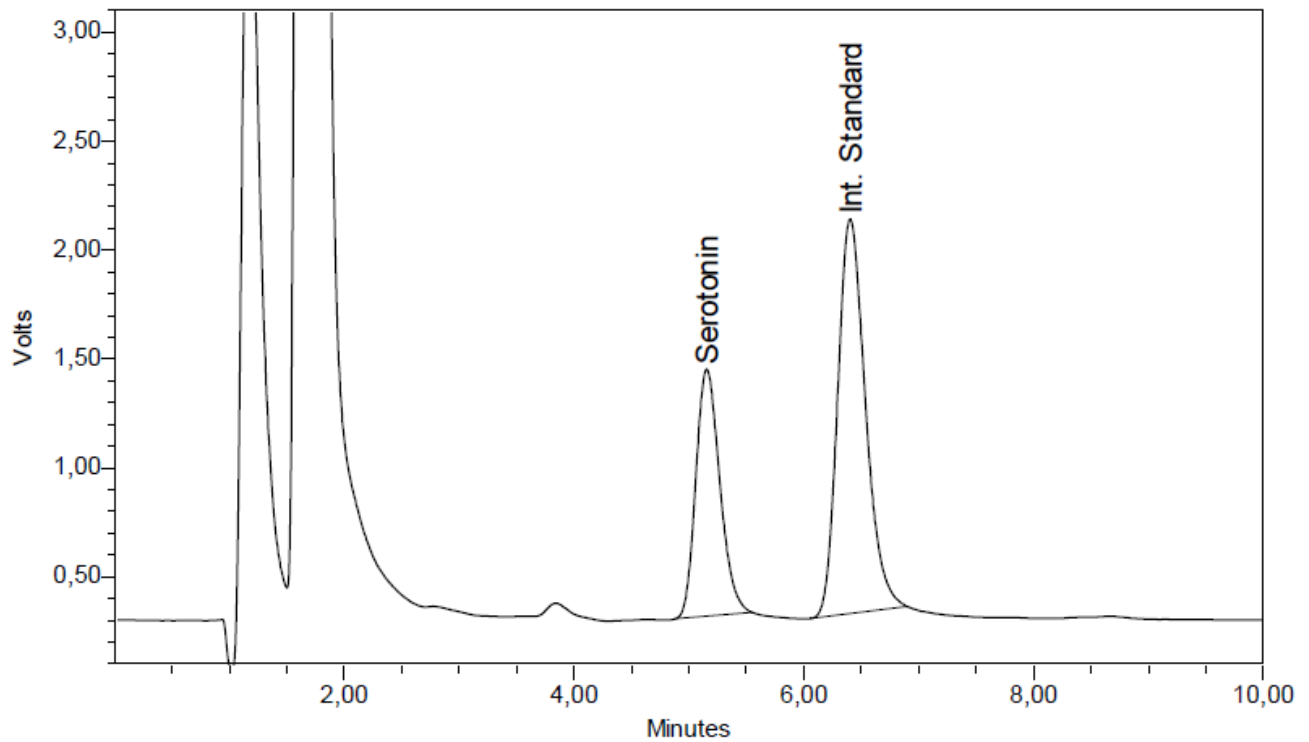
Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido estabelecido anteriormente, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles,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

11 Descarte de resíduos

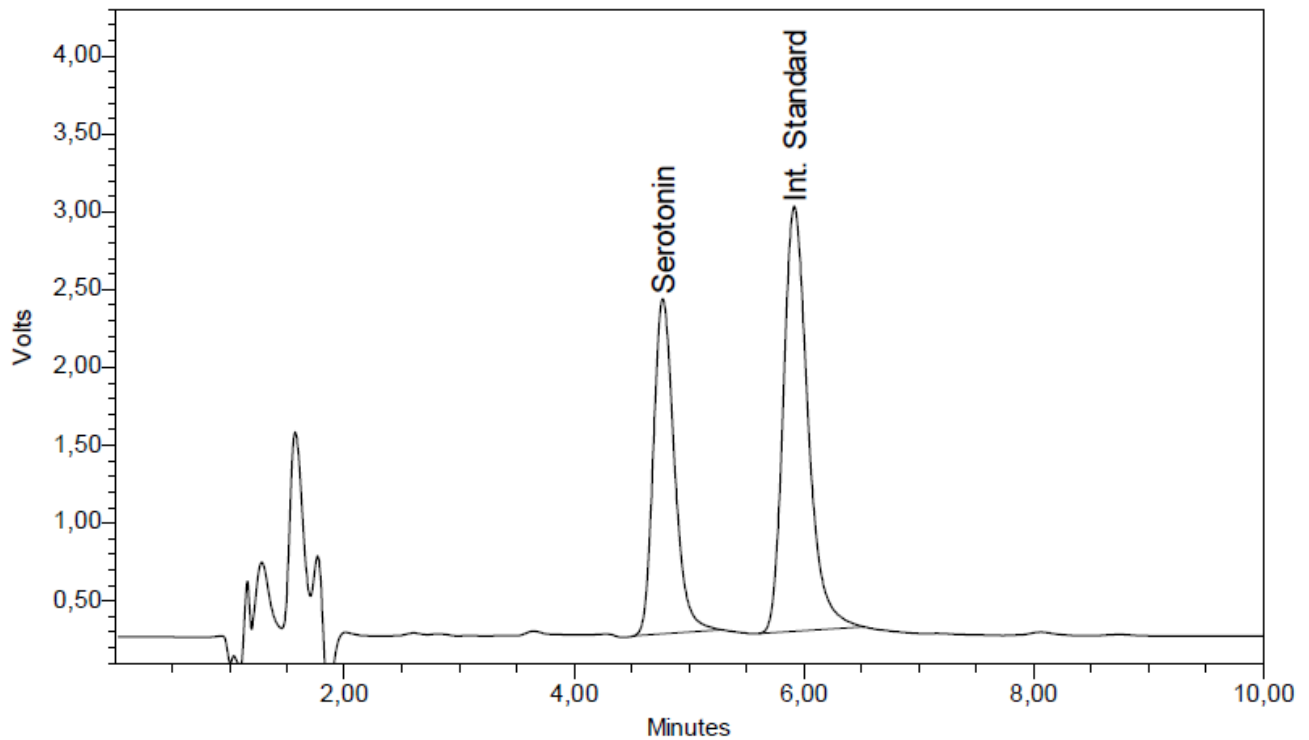
A fase móvel, o Padrão de Calibração e o Reagente de Precipitação contém **solventes orgânicos** e devem ser descartados como resíduos **livres de halogênios**, de acordo com as diretrizes locais e legislação vigente.

12 Exemplos de cromatogramas

12.1 Cromatograma de um padrão de calibração em soro



12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



Serotonina: 327 ng/ml (soro).

13 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	Desgaseificar 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	Usar forno para coluna
	Pequeno vazamento de uma das conexões do sistema	Apertar ou substituir os conectores capilares
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 muito baixo, acionar o serviço técnico
Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura ambiente	Usar forno para coluna
	Fluxo irregular	Checar bomba de HPLC (vazamentos, bolhas de ar)
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 por um curto período de tempo
	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	Substituir válvulas e selos de injeção feitos de Vespel® por materiais feitos de Tefzel®
Picos com ombros	Volume morto no sistema	Checar conexão dos capilares
Picos com cauda (<i>Tailing</i>)	Coluna de HPLC muito velha	Substituir a coluna
Alta pressão na coluna	Acúmulo de partículas na pré-coluna ou na própria coluna	Trocar o cartucho da pré-coluna ou a própria coluna
	Sistema de injeção bloqueado	Lavar o sistema de injeção com água, seguido de isopropanol e então água novamente

14 Literatura










1. Smythe GA. Serotonin. In: Gray CH, v. James HT (eds). *Hormones in Blood*. 3rd edit, Academic Press New York (1983).
2. Cooper JR, Bloom RH. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 5th edit, Oxford University Press New York (1986).
3. Stoward PJ. The possible role of 5-hydroxytryptamine in Duchenne's muscular dystrophy. In: de Clerck F, Vanhoutte PM (eds). *5-Hydroxytryptamine in peripheral reactions*. Raven Press New York (1982).
4. Keller R, Greiling H, Gressner AM (Greiling H, Gressner AM, Hrsg). In: *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer Verlag Stuttgart (1987).
5. Stahl SM, Woo DJ, Mefford IN, Berger PA, Ciaranello RD. (1983) Hyperserotonemia and platelet serotonin uptake and release in schizophrenia and affective disorders. *Am J Psychiatry* **140**(1): 26-30.
6. Grahame-Smith DG. The carcinoid syndrome. In: Truelove SC, Lee E (eds). *Topics in gastroenterology*. Blackwells London (1972).
7. Kuhn DM, Lovenburg W. Assay of serotonin, related metabolites and tryptophan hydroxylase. *Methods in biogenic amine research*, chapter 23. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1983).
8. Manz B, Kosfeld H, Harbauer G, Grill HJ, Pollow K. (1985) Radioimmunoassay of human serum serotonin. *J Clin Chem Clin Biochem* **23**(10): 657-62.
9. Mailman RB, Kilts CD. (1985) Analytical considerations for quantitative determination of serotonin and its metabolically related products in biological matrices. *Clin Chem* **31**(11): 1490-54.
10. Picard M, Olichon D, Gombert J. (1985) Determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* **34**(2): 445-51.
11. Jouve J, Martineau J, Mariotte N, Barthelemy C, Muh JP, Lelord G. (1986) Determination of urinary serotonin using liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* **378**(2):437-43.
12. Tagari PC, Boullin DJ, Davies CI. (1984) Simplified determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* **30**(1): 131-5.
13. Kitzrow W, Arbeitsgruppe Neurobiologie Prof. Uebhacker, Universitätsklinikum Charité-Psychiatrische Klinik, Berlin (1993-1998).
14. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Band 1 – Klinische Chemie 1. Aufl*, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007).
15. Hirowatari Y, Hara K, Shimura Y, Takahashi H. (2011) Serotonin levels in platelet-poor plasma and whole blood from healthy subjects: relationship with lipid markers and coronary heart disease risk score. *J Atheroscler Thromb* **18**(10): 874-82.
16. Thomas L (Hrsg). *Labor und Diagnose*. 7. Aufl, The-Books Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main (2008).
17. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. (1990) Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* **36**(12): 2117-20.
18. Brand T, Anderson GM. (2011) The measurement of platelet-poor plasma serotonin: A systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem* **57**(10): 1376-86.
19. Guder WG, Ehret W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Müller-Plathe O, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. (1998) Serum, Plasma oder Vollblut? Welche Antikoagulantien? Empfehlungen der Arbeitsgruppe Laboratoriumsmedizin. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* **29**(3): 81-103.

15 Agradecimentos

A Chromsystems agradece a assistência e os conselhos técnicos do **Dr. W. Kitzrow, Universitätsklinikum Charité, Berlin** na produção deste manual.

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) ou mediante solicitação.

Produto	Risco
Fase Móvel (artigo 3031/3032)   	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. 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 3033)   	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Pode causar danos aos órgãos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 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.
Reagente de Precipitação (artigo 3035)   	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Pode causar danos aos órgãos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 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.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União	

Europeia:

Padrão de calibração em soro (artigo 3009)
 Padrão interno (artigo 3034)
 Controles endócrinos em plasma (artigo 0010, 0020)
 Solução KCl 3M (artigo 41239)

Apêndice II: Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

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

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

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{Amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do padrão de calibração = $IS_{\text{Padrão}}$

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

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

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

Apêndice III: Validação

Para checar a linearidade e validar o método, as amostras de soro foram enriquecidas com porções de serotonina. Múltiplas alíquotas dessas preparações foram sujeitas ao procedimento de preparo da amostra.

Linearidade /limite de quantificação

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

Analito	Limite de quantificação* aprox. [µg/ml]	Faixa linear até pelo menos [µg/ml]
Serotonina	3	1000

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

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir do slope da curva de calibração das amostras de soro, plasma e sangue total e soluções de padrões diluídos.

Matriz	Faixa de recuperação Serotonina [%]	Faixa de recuperação Padrão Interno [%]
Soro	99	96
Plasma	95	94
Sangue total	87	90

Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir da determinação de múltiplas amostras (n=10) e determinação de serotonina em 3 concentrações diferentes.


Substância analisada	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg/l)		
	n=10	n=10	n=10
Serotonina	1.3 (157)	0.4 (255)	1.6 (324)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada em quadruplicata e da determinação das concentrações de serotonina em 2 pools de plasma em 20 séries de testes.

Substância analisada	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg/l)	
	n=80	n=80
Serotonina	1.2 (150)	1.0 (347)

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
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: Serotonine
Nomenclature code: 12-03-90-17-00
Classification: other product

Product name: **Serotonin in Serum/Plasma/Whole Blood**
Controls: **Plasma Endocrine 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 18950-0 Telefax: +49 89 18950-199	mail@chromsystems.de www.chromsystems.de
--	--	--	---



Certifiziert nach: DIN EN ISO 9001,
DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CMOR