

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

COENZYME Q10 IN SERUM/PLASMA/WHOLE BLOOD
(Coenzima Q10 em soro/plasma/sangue total)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa de *Coenzima Q10 (Ubiquinona)* em amostras de soro/plasma/sangue total por HPLC.

Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

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

Artigo	Apresentação
68000	Kit Reagente por HPLC para análise de Coenzima Q10 em plasma, soro e sangue total - 100 testes

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Coenzima Q10 in Serum/Plasma/Whole blood no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

A coenzima Q10 pertence à classe das ubiquinonas, que podem ser produzidas por quase todas as células do corpo. Ela tem duas principais funções bioquímicas no organismo: a produção de energia na forma de ATP (cadeia respiratória) e a formação e degradação de formas reativas de oxigênio. É originada a partir da síntese endógena e também pela ingestão de alimentos. A deficiência de ubiquinona pode, portanto, ter duas causas: uma dieta com falta de coenzima Q10, por exemplo baixo teor de gordura, dieta vegetariana desequilibrada ou má absorção de gordura; ou uma diminuição da síntese de coenzima Q10 pelo corpo, resultado de uma deficiência dos precursores de ubiquinona tais como: fenilalanina, niacina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico e vitaminas B6 e B12, e ainda a partir de várias drogas como a estatina (reduz os níveis de colesterol). A deficiência de coenzima Q10 pode levar a várias doenças tais como: doenças cardiovasculares, câncer ou doenças degenerativas como Morbus Parkinson.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

PRINCÍPIO

Este kit reagente permite o monitoramento específico do nível de coenzima Q10. A coenzima Q10 total é determinada na sua forma oxidada, ubiquinona. A coenzima Q10 reduzida, ubiquinol, é muito sensível à oxidação, que se inicia imediatamente após a coleta de sangue. Por isso, não é possível medir as concentrações fisiológicas reais de ambas as formas. Durante a preparação da amostra, traços de ubiquinol são oxidados e a coenzima Q10 total como ubiquinona é separada das proteínas lipofílicas. A solução resultante é então concentrada e limpa por extração em fase sólida.

A inclusão de um padrão interno minimiza as variações analíticas. A extração em fase sólida permite concentrar a coenzima Q10 sem a necessidade de uma etapa de evaporação. A utilização de hexano é evitada pela utilização de reagentes de precipitação apropriados. Hexano é prejudicial para os nervos e os pulmões e, portanto, deve ser evitada, se possível.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Acetonitrila 50-100%; metanol 10-<20%; propan-2-ol 10-<15%	1x1000 ml
Padrão Interno (Internal Standard)	Etanol 50-100%	25 ml
Reagente de Precipitação 1 (Precipitation Reagent1)	Acetato de etila 50 - <100%; etanol 10 - <25% ; ácido tricloroacético 10-<25%	50 ml
Reagente de Precipitação 2 (Precipitation Reagent2)	Ácido tricloroacético 25 - 50%; acetato de etila 25-50%	10 ml
Tampão de Lavagem 1 (Wash Buffer 1)	Metanol 20-55%	50 ml
Tampão de Lavagem 2 (Wash Buffer 2)	Metanol 55-100%	16 ml
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Acetato de etila 50 - <100%; propan-2-ol ≤ 25%	25 ml
Colunas de amostras (Sample Clean Up Columns)	-	2 x 50 unidades
Frascos de reação (Reaction vials)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada nos rótulos, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenamento para os reagentes do kit:

Produto	Temperatura
Fase móvel	Temperatura ambiente (18-30°C)
Padrão Interno	Abaixo de -18°C
Reagente de precipitação 1	Temperatura ambiente (18-30°C)
Reagente de precipitação 2	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de Lavagem 1	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de Lavagem 2	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de Eluição	Temperatura ambiente (18-30°C)
Colunas de amostras	Temperatura ambiente (18-30°C)
Frascos de reação	Temperatura ambiente (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, o padrão interno, as soluções de lavagem 1 e 2 e o tampão de eluição contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Reagente de Precipitação 1: pronto para uso.

Reagente de Precipitação 2: pronto para uso.

Tampão de Lavagem 1: pronto para uso.

Tampão de Lavagem 2: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, NÃO FORNECIDOS NO KIT

Coenzyme Q10 Plasma Calibration Standard (Chromsystems art. 68003).

Coenzyme Q10 Plasma Control, Bi-level (I + II) (Chromsystems art. 0091).

Água tipo I ou grau HPLC.

AMOSTRA

Amostras de Soro/Plasma/Sangue Total podem ser analisadas.

Estabilidade da amostra: as amostras devem ser mantidas frescas no transporte. As amostras coletadas desta forma são estáveis por 4 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento conservar congelado (abaixo de -18°C). Repetidos processos de congelamento e descongelamento devem ser evitados.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 50µL, tempo de corrida 14 min.
Detector UV:	Comprimento de onda de 275 nm
Fluxo:	2.5 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)
Solução de Lavagem para injetor	2-propanol

Procedimento de preparo de amostras em soro/plasma:

Precipitação:

1. Colocar 500 µL de plasma/soro e 250 µl do padrão interno (IS) em um frasco rotulado protegido da luz e misturar brevemente.
2. Adicionar 500 µl de reagente de precipitação 1 e misturar durante 30 segundos (vórtex).
3. Incubar 10 min a +2 - 8°C.
4. Centrifugar 5 minutos a 15.000 x g. Não é necessário transferir o sobrenadante para um novo frasco reacional.
5. Adicionar 100 µl de reagente de precipitação 2 e misturar durante 30 segundos (vórtex).
6. Centrifugar imediatamente durante 10 min a 15.000 x g.

Extração em fase sólida:

7. Aplicar todo o sobrenadante** a partir da etapa de precipitação a uma coluna de amostra identificada e extrair rapidamente por centrifugação (2 min a 700 x g) ou por sucção, descartar o efluente.
 8. Passar 500 µl de tampão de lavagem 1 através da coluna por centrifugação (1 min a 700 x g) ou por sucção, descartar o efluente.
 9. Passar 160 µl de tampão de lavagem 2 através da coluna por centrifugação (2 minutos a 700 x g) ou de sucção, descartar o efluente.
 10. Mudar o frasco, aplicar 250 µl tampão de eluição à coluna, e extrair completamente por centrifugação (2 minutos a 700 x g) ou por sucção.
 11. Injetar 50 µl do eluato no sistema HPLC.
- ** Em alguns casos, pode ser que o sobrenadante seja composto por duas fases, resultando em uma solução turva. Neste caso, é essencial colocar ambas as fases na coluna de amostra. A precisão e exatidão das análises devem ser monitorados pela inclusão de controles adicionais, em cada corrida analítica.

Importante:

- Adicionar o reagente de precipitação 2 após 5 minutos de centrifugação!
- Utilize apenas frascos de vidro para coletar o eluato.
- Se necessário, realizar o procedimento de limpeza da amostra em uma capela

Procedimento de preparo de amostras em sangue total:

Precipitação:

1. Colocar 250 µL de água destilada gelada em um frasco rotulado protegido da luz, e adicionar 250 µL de sangue total e misturar brevemente. Para certificar-se que o sangue foi transferido completamente enxaguar a ponteira várias vezes.
2. Adicionar 250 µl de padrão interno e misturar brevemente.
3. Adicionar 500 µl de reagente de precipitação 1 e misturar durante 30 segundos (vórtex).
4. Incubar 10 min a +2 - 8°C.
5. Centrifugar 5 minutos a 15.000 x g. Não é necessário transferir o sobrenadante para um novo frasco reacional.
6. Adicionar 100 µl de reagente de precipitação 2 e misturar durante 30 segundos (vórtex).
7. Centrifugar imediatamente durante 10 min a 15.000 x g.

Extração em fase sólida:

8. Aplicar todo o sobrenadante** a partir da etapa de precipitação a uma coluna de amostra identificada e extrair rapidamente por centrifugação (2 min a 700 x g) ou por sucção, descartar o efluente.
 9. Extrair 500 µl de tampão de lavagem 1 através da coluna por centrifugação (1 min a 700 x g) ou por sucção, , descartar o efluente.
 10. Extrair 160 µl de tampão de lavagem 2 através da coluna por centrifugação (2 minutos a 700 x g) ou de sucção, , descartar o efluente.
 11. Mudar o frasco, aplicar 250 µl tampão de eluição à coluna, e extrair completamente por centrifugação (2 minutos a 700 x g) ou por sucção.
 12. Injetar 50 µl do eluato no sistema HPLC.
- ** Em alguns casos, pode ser que o sobrenadante seja composto por duas fases, resultando em uma solução turva. Neste caso, é essencial colocar ambas as fases na coluna de amostra. A precisão e exatidão das análises devem ser monitorados pela inclusão de controles adicionais, em cada corrida analítica.

No cálculo quantitativo o fator de diluição "2" deve ser considerado de forma adequada.

Importante:

- Adicione reagente de precipitação 2 após 5 minutos de centrifugação!
- Utilize apenas frascos de vidro para coletar o eluato.
- Se necessário, realizar o procedimento de limpeza da amostra em uma capela

Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas podem ser mantidas por 24 horas a temperatura ambiente. Para períodos maiores de armazenamento, congelar (abaixo de -18°C).

Durante o armazenamento a temperaturas inferiores a + 4°C cristais podem se formar no eluato. Estes não se dissolvem quando a amostra é aquecida. Isso não afeta os resultados analíticos para estas amostras. Porém, tenha cuidado de não para injetar cristais no sistema de HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Coenzima Q10	11.2
Padrão Interno	6.9

CÁLCULOS

$$C_{\text{Amostra}} = \frac{A_{\text{Amostra}} / IS_{\text{Calibrador}} \times \text{Calibrador}}{A_{\text{Calibrador}} / IS_{\text{Amostra}}}$$

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

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_{Amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS_{Calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador = *C_{Calibrador}

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Coenzima Q10	X 1.158	X 0.863

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Produto	Apresentação
Coenzyme Q10 Plasma Calibration Standard	5 X 2 ml (liof.)
Coenzyme Q10 Plasma Control, Bi-level (I + II)	5 x 2 ml Level I e 5 x 2 ml Level II

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade e limite de detecção

Para verificar a linearidade e para validar o método, as amostras de plasma foram inoculadas com quantidades definidas de coenzima Q 10 (Ubiquinona). Várias alíquotas destas preparações foram sujeitas ao procedimento de preparação da amostra.

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de amostras de plasma sobrecarregadas e soluções padrão diluídas:

Analito	Recuperação [%]
Coenzima Q10	80
Padrão Interno	89

O método é linear desde o limite de quantificação designada até o limite superior indicado abaixo:

	Limite de quantificação (µg/L)	Faixa linear (µg/L)
Coenzima Q10	20	25000

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras (n=10) e da determinação da concentração da coenzima Q10 em três diferentes concentrações.

	CV % (Concentração µg/L)		
	n=10		
Coenzima Q10	2.6 (679)	4.6 (1013)	4.8 (1348)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de múltiplas limpezas e da determinação da concentração da coenzima Q10 em pool de plasma em 10 séries de ensaio diferente:

	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/l)	
	n = 100	
Coenzima Q10	5.8 (682)	4.3 (996)

VALORES DE REFERÊNCIA

O intervalo de referência a seguir foi retirado de literatura publicada e pode ser diferente de outros dados publicados [1, 2]. Como os intervalos de referência poderão variar significativamente dependentes do perfil da população, cada laboratório deve estabelecer um intervalo de referência no que diz respeito às características específicas da sua população local.

Analito	Faixa de Referência [1, 2] [µg/l]	Faixa de Referência [5] [µg/l]	
	Adultos, em plasma	Mulheres	Homens
Coenzima Q10	750-1000	450-1050	500-1100

LITERATURA

1. Overvad K., Diamant B., Holm I. et al. : Eur. J. Clin. Nutr. 53, 764-770 (1999).
2. Iittaru G. P., Battino M., Tomasetti M. et al.: Molec. Aspects. Med. 15 (Supplement), 67-72 (1994).
3. Crane F. I.: J. Am. Coll. Nutr. 20, 591-598 (2001).
4. Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (6. Aufl.), Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 804-805 (1992).
5. Bayer W, Schmidt K. (2002) Coenzyme Q10-Aktueller Erkenntnisstand. Ernährung & Medizin 17: 138-40.

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 10350840268

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

www.biosys.com.br