

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

MONITORING VON OXIDATIVEM STRESS

MONITORING OXIDATIVE STRESS

SUIVI DU STRESS OXYDATIF

MONITORAGGIO DELLO STRESS OSSIDATIVO

MONITORIZACIÓN DEL STRESS OXIDATIVO



Manual de Instruções para Análise por HPLC de β -Caroteno em Soro/Plasma

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa de β -caroteno em soro/plasma por HPLC. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 32000

CE

**B-CAROTENO EM SORO/ PLASMA – HPLC
β-CAROTENE IN SERUM/PLASMA– HPLC
MS: 10350840180**

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com o DIN EN ISO 9001 e DIN EN ISO 13485 e ISO 13485 CMDR. 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

1	Informações para requisição	3
2	Introdução.....	4
3	Sistema HPLC	5
3.1	Parâmetros do equipamento	5
3.2	Coluna HPLC	5
3.3	Shut down	6
4	Separação cromatográfica	6
5.1	Coleta e armazenamento das amostras de pacientes	6
5.2	Reconstituição do calibrador	6
5.3	Reconstituição dos controles.....	7
5.4	Procedimento de preparo das amostras	7
5.5	Estabilidade das amostras.....	8
6	Resultados e avaliação	8
6.1	Calibração do sistema de análise.....	8
6.2	Quantificação por padrão interno	8
7	Controle de Qualidade	8
8	Valores de referência	9
9	Fatores de Conversão.....	9
10	Armazenamento e validade dos reagentes.....	9
11	Descarte de resíduos	9
12	Exemplos de cromatogramas.....	10
12.1	Cromatograma de um padrão de calibração	10
12.2	Cromatograma de uma amostra de paciente	10
16	Problemas e Soluções	11
17	Literatura	12
	Apêndice I: Informações de segurança	13
	Apêndice II: Cálculo manual	14
	Apêndice III: Validação	15
	Apêndice IV: Declaração de Conformidade	16

1 Informações para requisição

Nº da ordem	Produto																																												
32000	Kit reagente para determinação de β-Caroteno em soro/ plasma por HPLC Conteúdo para 100 análises: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 80%;">Fase Móvel</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> <tr> <td>Padrão de Calibração em Soro (liof.)</td> <td style="text-align: right;">5 x 0,5 ml</td> </tr> <tr> <td>Padrão Interno</td> <td style="text-align: right;">5 ml</td> </tr> <tr> <td>Reagente de Precipitação</td> <td style="text-align: right;">5ml</td> </tr> <tr> <td>Tampão de Extração</td> <td style="text-align: right;">20 ml</td> </tr> <tr> <td>Vials de reação âmbar</td> <td style="text-align: right;">100 unidades</td> </tr> </table> <p>Componentes disponíveis separadamente:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 80%;">32001 Fase Móvel</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> <tr> <td>32002 Fase Móvel</td> <td style="text-align: right;">10 x 1000 ml</td> </tr> <tr> <td>32003 Padrão de Calibração em Soro (liofilizado)</td> <td style="text-align: right;">5 x 0,5 ml</td> </tr> <tr> <td>32004 Padrão Interno</td> <td style="text-align: right;">5 ml</td> </tr> <tr> <td>32005 Reagente de Precipitação</td> <td style="text-align: right;">5 ml</td> </tr> <tr> <td>32006 Tampão de Extração</td> <td style="text-align: right;">20 ml</td> </tr> <tr> <td>33005 Vials de reação, âmbar (proteção contra luz)</td> <td style="text-align: right;">100 unidades</td> </tr> </table> <p>Acessórios</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 80%;">32100 Coluna HPLC para determinação de β-caroteno em soro/ plasma (equilibrada, com cromatograma teste)</td> <td style="text-align: right;">1 peça</td> </tr> <tr> <td>15009 Pré-filtro em PEEK, 5μm</td> <td style="text-align: right;">5 peças</td> </tr> <tr> <td>15010 Suporte para pré-filtro em PEEK</td> <td style="text-align: right;">1 peça</td> </tr> <tr> <td>18001 Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10</td> <td style="text-align: right;">1 peça</td> </tr> <tr> <td>18032 Cartucho de pré-coluna 4/10</td> <td style="text-align: right;">1 peça</td> </tr> </table> <p>Calibradores e Controles (liofilizados)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 80%;">32003 Padrão de Calibração em Soro</td> <td style="text-align: right;">5 x 0,5 ml</td> </tr> <tr> <td>0025 Controle bi-nível (I + II) de β-caroteno em soro</td> <td style="text-align: right;">2 x 5 x 2 ml</td> </tr> <tr> <td>0026 Controle nível I de β-caroteno em soro</td> <td style="text-align: right;">5 x 2 ml</td> </tr> <tr> <td>0027 Controle nível II de β-caroteno em soro</td> <td style="text-align: right;">5 x 2 ml</td> </tr> </table>	Fase Móvel	1000 ml	Padrão de Calibração em Soro (liof.)	5 x 0,5 ml	Padrão Interno	5 ml	Reagente de Precipitação	5ml	Tampão de Extração	20 ml	Vials de reação âmbar	100 unidades	32001 Fase Móvel	1000 ml	32002 Fase Móvel	10 x 1000 ml	32003 Padrão de Calibração em Soro (liofilizado)	5 x 0,5 ml	32004 Padrão Interno	5 ml	32005 Reagente de Precipitação	5 ml	32006 Tampão de Extração	20 ml	33005 Vials de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades	32100 Coluna HPLC para determinação de β -caroteno em soro/ plasma (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça	15009 Pré-filtro em PEEK, 5 μ m	5 peças	15010 Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça	18001 Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça	18032 Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça	32003 Padrão de Calibração em Soro	5 x 0,5 ml	0025 Controle bi-nível (I + II) de β -caroteno em soro	2 x 5 x 2 ml	0026 Controle nível I de β -caroteno em soro	5 x 2 ml	0027 Controle nível II de β -caroteno em soro	5 x 2 ml
Fase Móvel	1000 ml																																												
Padrão de Calibração em Soro (liof.)	5 x 0,5 ml																																												
Padrão Interno	5 ml																																												
Reagente de Precipitação	5ml																																												
Tampão de Extração	20 ml																																												
Vials de reação âmbar	100 unidades																																												
32001 Fase Móvel	1000 ml																																												
32002 Fase Móvel	10 x 1000 ml																																												
32003 Padrão de Calibração em Soro (liofilizado)	5 x 0,5 ml																																												
32004 Padrão Interno	5 ml																																												
32005 Reagente de Precipitação	5 ml																																												
32006 Tampão de Extração	20 ml																																												
33005 Vials de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades																																												
32100 Coluna HPLC para determinação de β -caroteno em soro/ plasma (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça																																												
15009 Pré-filtro em PEEK, 5 μ m	5 peças																																												
15010 Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça																																												
18001 Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça																																												
18032 Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça																																												
32003 Padrão de Calibração em Soro	5 x 0,5 ml																																												
0025 Controle bi-nível (I + II) de β -caroteno em soro	2 x 5 x 2 ml																																												
0026 Controle nível I de β -caroteno em soro	5 x 2 ml																																												
0027 Controle nível II de β -caroteno em soro	5 x 2 ml																																												

2 Introdução

O β -caroteno faz parte da família dos carotenoides, e uma característica comum dessa família, além da coloração laranja amarelada ao vermelho, é a estrutura de poliisopreno do núcleo. Uma grande quantidade de ligações duplas conjugadas faz esse componente muito sensível a oxidação pela luz e dá origem a vários isômeros, como por exemplo o *cis*- β -caroteno e o *trans*- β -caroteno. A diferença do α -caroteno e do β -caroteno é a posição de somente uma ligação dupla.

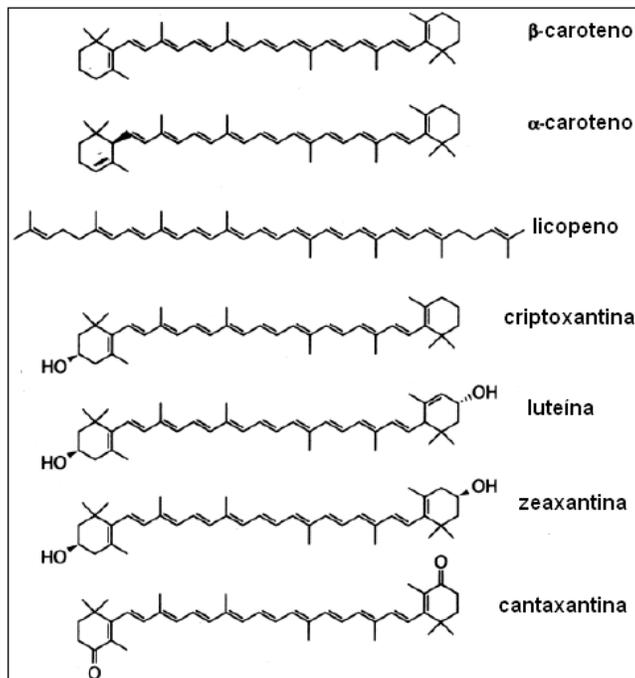


Figura 1 – Fórmulas estruturais dos carotenoides mais importantes (quanto mais ligações duplas no composto, o efeito antioxidante é mais forte).

Os carotenoides são sintetizados somente por organismos ativos fotossintetizantes, como algumas bactérias, algas e vegetais superiores e funcionam como aceptores de luz protetores de pigmentos fotossintetizantes (clorofila). Em humanos o *trans*- β -caroteno é funcionalmente e quantitativamente o mais importante dos cerca de 20 carotenoides presentes no plasma. Ele é repostado com a dieta e absorvido no intestino delgado juntamente com a gordura na presença de bile. Uma fração do β -caroteno é transformada enzimaticamente em vitamina A (retinol) pelos enterócitos e hepatócitos, uma das funções mais importantes da provitamina A. O β -caroteno altamente solúvel em gordura é transportado por lipoproteínas chamados quilomícrons no sangue e na linfa. O armazenamento no corpo é feito no tecido adiposo e no fígado.

O β -caroteno é uma substância essencial para os seres humanos, a Sociedade Alemã de Nutrição recomenda a ingestão de 2-4 mg/dia na dieta. O β -caroteno tem propriedades antioxidantes e é capaz de “eliminar” os radicais livres e moléculas de oxigênio agressivas. Essas moléculas reativas e tóxicas são normalmente geradas no metabolismo normal, mas estão em maior quantidade durante processos inflamatórios ou como consequência do aumento dos níveis de homocisteína. Essas substâncias podem causar danos à membrana celular e ao DNA e são consideradas como fator de risco para doenças cardiovasculares. Estudos clínicos realizados nos últimos anos mostraram que um suporte de β -caroteno adequado pode ser considerado como fator de proteção contra arteriosclerose, doença coronariana e câncer. Por estimular a atividade dos linfócitos T e B, o β -caroteno pode contribuir na estimulação do sistema imune. Os carotenoides como o licopeno, α -caroteno e *cis*- β -caroteno, presentes em concentrações menores no sangue, desempenham um papel secundário nessa função. Por outro lado, outros estudos implicaram fortemente que altas doses de β -caroteno aumenta o risco de câncer de pulmão em fumantes, portanto ainda não há uma conclusão sobre os efeitos fisiológicos do β -caroteno. Na bioquímica clínica a concentração do β -caroteno no soro é um marcador de distúrbios de absorção de gordura pelo trato digestivo.

Uso específico:

O kit de reagentes da Chromsystems para análise de β -caroteno em soro/plasma é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de α -, *cis*- β - e *trans*- β -caroteno totais amostras de soro e plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit é designado para o teste em pacientes cujo nível de β -caroteno requer monitoramento.

Princípio do kit:

O β -caroteno é extraído da amostra de soro por uma precipitação/extração combinada. O resultado da extração é solúvel na fase móvel e pronto para ser injetado, portanto não é necessária etapa de evaporação.

Sistema isocrático, fase reversa com detecção UV/VIS, assegura separação segura de α -caroteno, *cis*- β -caroteno e todos os *trans*- β -carotenos bem como alguns outros carotenoides em menos de 10 minutos. Para uma determinação precisa, um padrão interno derivado de carotenoide é utilizado. Somente um comprimento de onda é utilizado para detecção. Devido à estabilização especial das amostras preparadas, o método é compatível com grandes lotes de amostras.

3 Sistema HPLC

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no apêndice I.

3.1 Parâmetros do equipamento

Um sistema simples, isocrático, com bomba de HPLC, injetor e detector UV é o requerido para a análise de β -caroteno. Para prevenir mudanças na composição da fase móvel, ela não deve ser degaseificada, e deve ser mantida tampada durante o procedimento do teste. O uso de forno termostatizado para a coluna previne variações de temperatura e garante ótima estabilidade e reprodutibilidade na separação cromatográfica.

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção 50 μ L
Tempo de corrida:	10 min
Fluxo:	1,5 - 1,8 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector UV:	453 nm
Solução de limpeza da agulha do injetor:	metanol puro ou acetonitrila

3.2 Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise de β -caroteno/carotenóides é fornecida estabilizada e testada, e está pronta para o uso. **Ela não deve ser lavada com nenhuma outra solução.** A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 1,8 mL/min é de cerca de 70 a 90 bar e pode elevar com a idade ou uso da coluna. Para prevenir o aumento da contrapressão da coluna é recomendável injetar 50 μ L água destilada após cada série de 20 amostras. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância. Para prolongar a vida da coluna, uma pré-coluna (artigo 18001 e 18032) podem ser utilizados.

Antes de iniciar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna HPLC, lavar o sistema com aproximadamente 50 mL de água destilada seguidos de 50 mL de fase móvel com razão de fluxo de 1,8 mL/min. e injetar cada solução várias vezes;
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 1,8 mL/min por aproximadamente 10 min, até que a linha de base esteja estabilizada;
3. Injetar o calibrador preparado repetidamente até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção e área/altura de picos semelhantes;
4. Então, a fase móvel pode ser recirculada;

3.3 Shut down

Para período de desuso de até 3 dias, desligar a bomba de HPLC e o detector, a coluna de HPLC pode permanecer conectada no sistema. Para longos períodos de desuso, a coluna HPLC deve ser desconectada. Limpeza ou conservação não é necessária. Armazenar a coluna na fase móvel a temperatura ambiente. A coluna deve ser substituída por uma união e o sistema HPLC limpo com cerca de 50 mL de H₂O/metanol (30/70 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra o tempo de retenção de alguns carotenoides e padrão interno com razão de fluxo de 1,8 mL/min:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Criptoxantina	3,1
Padrão Interno	3,8
Isômeros de licopeno	5,2
α -caroteno	7,7
Trans- β -caroteno	8,3
Cis- β -caroteno	9,0

A separação cromatográfica leva cerca de 10 minutos (ver cromatogramas no Cap. 12). Pequenas variações nos tempos de retenção podem ser devidas, e. mudanças de temperatura ou o processo normal de envelhecimento da fase móvel.

5 Preparo da amostra

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no apêndice I.

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

A amostra utilizada para análise é de soro ou plasma.

A seguinte informação pode ser encontrada na literatura [7]:

Antes de coletar o sangue, evite o consumo de cenouras e laranjas. Níveis aumentados podem ser encontrados após o uso de bronzeadores e níveis diminuídos após a utilização de canamicina, metformina neomicina e contraceptivos orais. O soro deve ser enviado protegido da luz e não deve ser hemolítico. O envio e a análise devem ser feitos no mesmo dia, ou então congeles as amostras e faça o envio com as amostras congeladas.

Atenção: É de responsabilidade individual de cada laboratório usar todas as referências disponíveis ou seus próprios estudos para determinar os critérios de estabilidade para o seu laboratório.

5.2 Reconstituição do calibrador

O calibrador (artigo 32003) é rastreável a substâncias de referência adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. O calibrador preparado é utilizado para calibrar o sistema. **Para reconstituir o calibrador liofilizado em soro, pipetar exatamente 0,5 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evite exposição direta a luz solar! A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de plasma humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV-1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPHA. Como não existem métodos que dêem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador reconstituído:

O calibrador reconstituído é estável por até 5 dias quando mantido fechado, protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até 2 meses), alíquotar e armazenar abaixo de -18 °C.

5.3 Reconstituição dos controles

Os controles em soro (artigo 0026, 0027), 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 2,0 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evite exposição direta a luz solar! A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de plasma humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV-1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPHA. Como não existem métodos que dêem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O controle reconstituído é estável por até 5 dias quando mantido fechado, protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até 2 meses), alíquotar e armazenar abaixo de -18 °C.

5.4 Procedimento de preparo das amostras

Num frasco de reação âmbar (proteção contra luz), pipetar:

1. Aplicar 100 µl de soro/plasma (calibrador, controle, amostra).
2. + 50 µL de padrão interno, homogeneizar.
3. + 50 µL de reagente de precipitação, misturar com vórtex, (não centrifugar!).
4. + 200 µL de tampão de extração, misturar com vórtex por 30 s.
5. Centrifugar por 10 min. a 16000 g.
6. Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro* protegido da luz, injetar 50 µL no sistema de HPLC.

A precisão e exatidão da análise devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais a cada corrida.

*Nem todo frasco de plástico é adequado para armazenar o extrato, utilizar frasco de vidro se houver dúvida.

5.5 Estabilidade das amostras

As amostras preparadas são estáveis em temperatura ambiente por 2 dias e por aproximadamente 1 semana refrigerada entre +2° e +8°C (em frasco de vidro protegido da luz). Para maiores períodos de armazenagem, (até 4 semanas) congelar à -18°C.

6 Resultados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

A concentração de β -caroteno no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o padrão.

Antes de iniciar a análise quantitativa de amostras de pacientes, é recomendado correr um cromatograma de calibração contendo todas as substâncias de interesse. Após a estabilização da linha de base, injete repetidamente o calibrador preparado, até que dois cromatogramas sucessivos apresentem picos com tempo de retenção, resolução e área/altura praticamente idênticos. Esses cromatogramas podem ser utilizados para definir corretamente os parâmetros de integração. O cromatograma da última injeção teste é usado para calibrar o sistema de análise de dados (software, integrador).

Entre com o tempo de retenção obtido e a concentração do calibrador (veja folheto de informações) na tabela de análise.

N° do Pico	Analito	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)	Concentração (ng/mL)
1	Padrão Interno	3,8	1
2	Trans- β -caroteno	8,3	Ver folheto de informações

Para assegurar que nem a calibração nem as condições do HPLC (tempos de retenção, etc.) modificaram-se no decorrer da corrida analítica, o calibrador preparado deve ser injetado no curso da corrida e novamente no final. Escolha “Calibração por Padrão Interno” como método de integração.

6.2 Quantificação por padrão interno

O uso de um padrão interno permite que potenciais perdas durante o preparo da amostra sejam compensadas. Uma quantidade conhecida de padrão interno é adicionada a cada amostra (calibrador, controles, amostras de pacientes). O pico apropriado é identificado na tabela de componentes como padrão interno a partir da corrida do calibrador (veja cromatogramas no cap. 12) para a correta integração. **Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao plasma calibrador e as amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser entrada como “1”.**

7 Controle de Qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Controles em soro Chromsystems (artigos 0026, 0027). Caso a análise desses controles mostre resultados fora do intervalo fornecido nos folhetos de informação, o sistema deve ser avaliado, e, se necessário, recalibrado.

8 Valores de referência

Na literatura estão disponíveis diferentes valores de referência para β -caroteno:

Substância	Matriz	Faixa de Referência	Fonte
B-caroteno	Soro	40-322 ng/ml	[7]
B-caroteno	Soro	67-228 ng/ml (25 ^o e 75 ^o percentis da população de estudo)	[8]

Também existem valores altos citados (acima de 1250 ng/mL). Por um lado, isso ocorre devido a diferenças da população e por outro lado devido as diferentes metodologias para sua determinação além do HPLC, por exemplo ensaios fotométricos, que não são adequados os trans- β -carotenos seletivamente na amostra com outros carotenoides.

9 Fatores de Conversão

Analito	ng/mL para nmol/L	nmol/L para ng/mL
β -caroteno	x 1,863	x 0,537

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 indicadas no rótulo sejam obedecidas.

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	+18 a +30°C
Padrão Interno	Abaixo de -18 °C
Reagente de Precipitação	+18 a +30°C
Tampão de Extração	+18 a +30°C
Padrão de Calibração em Soro	abaixo de -18 °C
Controles nível I e nível II, em Soro	abaixo de -18 °C

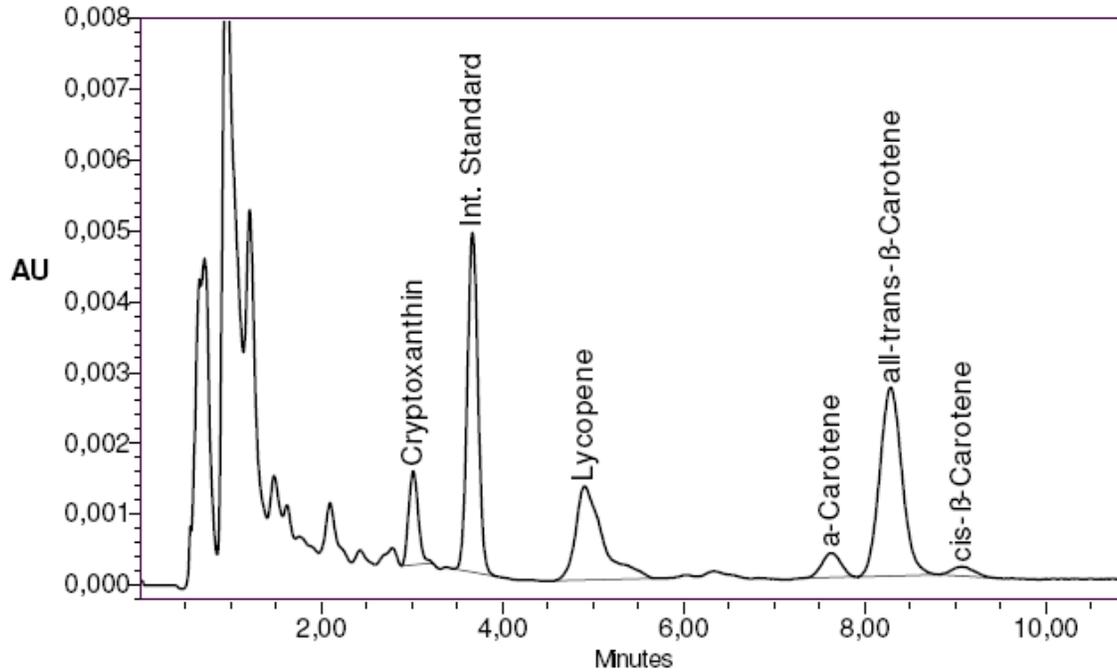
Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2 e 5.3.

11 Descarte de resíduos

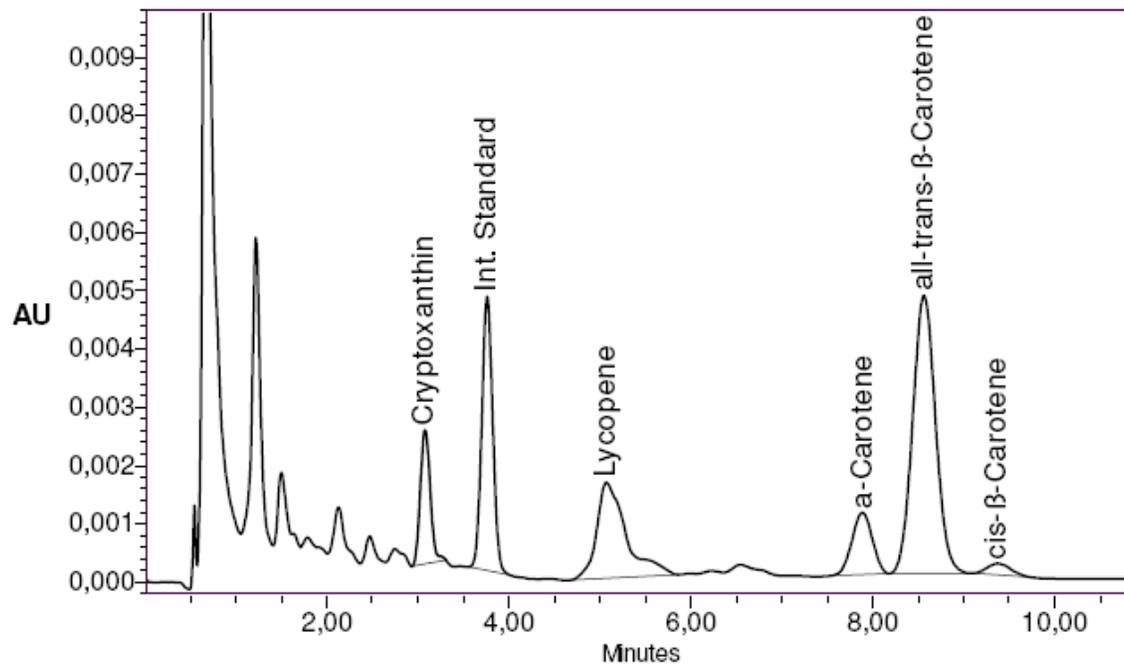
A Fase Móvel, o Padrão Interno, o Reagente de Precipitação, o Tampão de Extração e os resíduos dos espécimes preparados contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. Estes produtos não devem ser descartados juntamente com lixo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

12 Exemplos de cromatogramas

12.1 Cromatograma de um padrão de calibração



12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



Trans-β-caroteno: 648 ng/mL

13 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Flutuações na linha de base	Lâmpada do detector ainda não aquecida	Aguardar
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Sistema ainda não equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Variação de temperatura	Usar forno para coluna
	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
Linha de base instável	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
Picos interferentes	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol
	Sistema de injeção contaminado	Limpar o sistema com metanol ou injetar a fase móvel 10 x.
	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
Alargamento de picos, cauda	Coluna HPLC velha	Substituir a coluna
	Pré-coluna velha	Substituir a pré-coluna
Picos duplicados	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna HPLC	Substituir a coluna
Sem picos	Vazamento no sistema	Verificar o injetor, pressão
Sem sinal	Conexão com integrador ou impressora defeituosa ou interrompida	Verificar o sinal do cabo e as conexões
	Lâmpada do detector	Verificar a voltagem da lâmpada, substituir se necessário
Sensibilidade diminuindo	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
Mudanças no tempo de retenção	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
	Razão de fluxo instável pulsção da bomba	Avaliar bomba do HPLC
	Sistema não está equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
Pressão da coluna alta	Pré-coluna velha	Injetar 100 µl de água destilada diversas vezes
		Substituir cartucho de pré-coluna

14 Literatura

1. Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier P, Le Moël G, Steghens JP, Van Kappel A, Nabet F. (1999) Carotenoids: 1. Metabolism and physiology. *Ann Biol Clin* **57**(2): 169-83.
2. Manson JE, Gaziano JM, Jonas MA, Hennekens CH. (1993) Antioxidants and cardiovascular disease: a review. *J Am Coll of Nutr* **12**(4): 426-32.
3. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh Jp, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**(18):1150-5.
4. Hughes DA, Wright AJ, Finglas PM, Peerless AC, Bailey AL, Astley SB, Pinder AC, Southon S. (1997) The effect of beta-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers. *J Lab Clin Med* **129**(3): 309-317.
5. Biesalski HK, Schrezenmeier J, Weber P, Weiß H (Hrsg). Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1997).
6. Neue referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. (2000) *Dtsch Ärztebl* **97**(16): A-1048.
7. Krapf FE, Bieger WP, Tiller FW. Labordatenbuch. Verlag Urban & Schwarzenberg München (1995):S. 71.
8. Mayne ST, Cartmel B, Silva F, Kim CS, Fallon BG, Briskin K, Zheng T, Baum M, Shor-Posner G, Goodwin WJ Jr. Effect of supplemental beta-carotene on plasma concentrations of carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol in humans. (1998) *Am J Clin Nutr* **68**(3): 642-7.

Apêndice I: Informações de segurança

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. As cláusulas R/S podem ser obtidas nos respectivos folhetos de segurança dos materiais (www.chromsystems.de) ou mediante solicitação.

Produto	Risco
Fase Móvel (artigo 32001, 32002)   	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa irritação séria aos olhos. H351 Suspeita de ser cancerígeno. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Mantenha longe do aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. 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
Padrão Interno (artigo 32004) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. P210 Mantenha longe do aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.
Reagente de Precipitação (artigo 32005) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. P210 Mantenha longe do aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.
Tampão de Extração (artigo 32006)  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302 Tóxico por inalação. H315 Causa irritação na pele. H318 Causa danos sérios aos olhos. H335+H336 Pode causar irritação respiratória. Pode causar sonolência e tontura. P210 Mantenha longe do aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P358 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos.



Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando.
 P304+P340 Em caso de inalação: transfira a vítima para um local com ar fresco e a mantenha descansando em uma posição confortável para a respiração.
 P302+P352 Em caso de contato com a pele: lavar abundantemente com água e sabão.
 P403+P235 Armazenar em local bem-ventilado. Manter refrigerado.

Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:

Padrão de calibração em soro (artigo 32003)
 Controles em soro (artigo 0025, 0026, 0027)

Apêndice II: Cálculo manual

Para o cálculo manual os seguintes dados são necessários:

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra	= A_{Amostra}
Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador	= $A_{\text{Calibrador}}$
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= IS_{Amostra}
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador	= $IS_{\text{Calibrador}}$
Concentração C do analito A no calibrador (veja folheto de informações)	= $C_{\text{Calibrador}}$

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

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

Apêndice III: Validação

Para verificar a linearidade e validar o método, amostras de plasma foram fortificadas com quantidades definidas de *trans*- β -caroteno. Múltiplas alíquotas foram submetidas ao processo de preparo.

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do coeficiente angular da curva de calibração das amostras de plasma fortificadas e de diluições de soluções padrão:

Matriz	Taxa de Recuperação <i>trans</i> - β -caroteno totais [%]	Taxa de Recuperação do Padrão Interno [%]
Soro	107	110
Plasma	107	110

Linearidade e limite de quantificação:

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

Analito	Limite de quantificação aprox. [ng/ml]	Faixa Linear até pelo menos [ng/ml]
<i>trans</i> - β -caroteno totais	5	3000

*O limite de quantificação depende do detector usado.

Precisão intra-ensaio:

O coeficiente de variação (CV) para o *trans*- β -caroteno foi determinado em diferentes concentrações por múltiplas diluições da mesma amostra:

Analito	Coeficiente de variação [%] (em uma concentração em ng/ml)	
	n = 10	
<i>trans</i> - β -caroteno totais	0.8 (343)	2.0 (685)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n=4) e determinação da concentração do analito em *pool* de 2 soros em 20 diferentes séries de testes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em ng/mL)	
	n = 80	
<i>trans</i> - β -caroteno totais	2.3 (357)	3.1 (689)

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: Other Other Clinical Chemistry Reagents
Nomenclature code: 11-90-01-90-00
Classification: other product

Product name: **β-Carotene in Serum/Plasma**
Controls: **β-Carotene Serum Control**

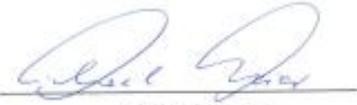
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

Conformity assessment procedure:
Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:
EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 13640, EN 13641

Notified body: -

Munich, March 27, 2014


 Michael Meier
 General Manager

Vers. 2.1

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH Am Haag 12 82166 Gräfelfing, Germany Telefon: +49 89 18933-0 Telefax: +49 89 18933-199 mail: info@chromsystems.de www.chromsystems.de  Zertifiziert nach: DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CDR