

VITAMINSTATUS
VITAMIN PROFILING
DOSAGE DE VITAMINES
PROFILO DELLE VITAMINE
PERFIL DE VITAMINAS



Manual de Instruções para Análise por HPLC de Vitamina B₂ em Sangue Total

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₂ em sangue total por HPLC.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 37000

VITAMINA B₂ EM SANGUE TOTAL- HPLC
VITAMIN B2 (FAD, FMN, RIBOFLAVIN TOTAL) IN WHOLE BLOOD – HPLC
MS 10350840186

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	6
3.1	Parâmetros do equipamento	6
3.2	Coluna HPLC	6
3.3	Shut down.....	6
4	Separação cromatográfica.....	7
5	Preparo da amostra	7
5.1	Coleta e armazenamento das amostras de pacientes	7
5.2	Reconstituição do calibrador em sangue total	7
5.3	Reconstituição dos controles em sangue total	8
5.4	Procedimento de preparo das amostras	8
5.5	Estabilidade das amostras preparadas	9
6	Resultados e avaliação	9
	Calibração do sistema de análise	9
7	Controle de Qualidade	9
8	Valores de referência	10
9	Fatores de Conversão.....	10
10	Armazenamento e validade dos reagentes	10
11	Descarte de resíduos.....	10
12	Exemplos de cromatogramas	11
12.1	Cromatograma de um calibrador em sangue total	11
12.2	Cromatograma de uma amostra de paciente	11
13	Problemas e Soluções.....	12
14	Literatura.....	13
	Apêndice I: Informações de segurança	14
	Apêndice II: Cálculo Manual.....	15
	Apêndice III: Verificação	16
	Apêndice IV: Declaração de Conformidade	17

1 Informações para requisição

Nº da ordem	Produto	
37000	Kit reagente para determinação de Vitamina B₂ em sangue total por HPLC, para 100 análises:	
	Fase Móvel	1000 mL
	Tampão de Extração	20 mL
	Reagente de Precipitação	40 mL
	Tampão de Neutralização	10 mL
	Padrão de Calibração em sangue total (liof.)	5 x 1 mL
	Tubos de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades
	Componentes disponíveis separadamente:	
37011	Fase Móvel	1000 mL
37022	Fase Móvel	10 x 1000 mL
37005	Tampão de Extração	20 mL
37007	Reagente de Precipitação	40 mL
37099	Tampão de Neutralização	10 mL
37008	Padrão de Calibração em Sangue Total (liofilizado)	5 x 1 mL
33005	Tubos de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades
	Acessórios	
37100	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK 5µm	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça
17001	Suporte para cartucho de pré-coluna	1 peça
17037	Cartucho de pré-coluna	1 peça
	Calibrador e controles Chromsystems para vitamina B1 e vitamina B2 no sangue total	
37008	Padrão de Calibração em sangue total (liof.)	5 x 1 mL
0033	Controle bi-nível (I + II) em sangue total (liof.)	2 x 5 x 2 mL
0034	Controle nível I em sangue total (liof.)	5 x 2 mL
0035	Controle nível II em sangue total (liof.)	5 x 2 mL

2 Introdução

A Riboflavina (vitamina B₂) pertence ao complexo de Vitamina B, um grupo heterogêneo de vitaminas hidrossolúveis que são precursoras de coenzimas. As coenzimas flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) são derivadas da riboflavina. Devido a capacidade do grupo protético das flavoenzimas, elas são responsáveis pela transferência de hidrogênio. As flavoproteínas são essenciais para a cadeia respiratória, para o metabolismo dos carboidratos, a degradação de ácidos graxos, desaminação oxidativa de aminoácidos e para outros processos de redução. A Riboflavina também é muito importante para a atividade principal da glutiona redutase, que age indiretamente como anti-oxidante.

Estrutura química

A Riboflavina é um derivado da isoloxazina, que está ligado ao álcool do açúcar ribidol (fig.1). A fosforilação da cadeia lateral ribitol resulta na flavina mononucleotídeo (FMN). A flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) é formada pela ligação da FMN com uma adenosina monofosfato. A Riboflavina é sensível a luz, mas muito resistente ao calor. Devido a sua cor amarela intensa é usado como corante em alimentos.

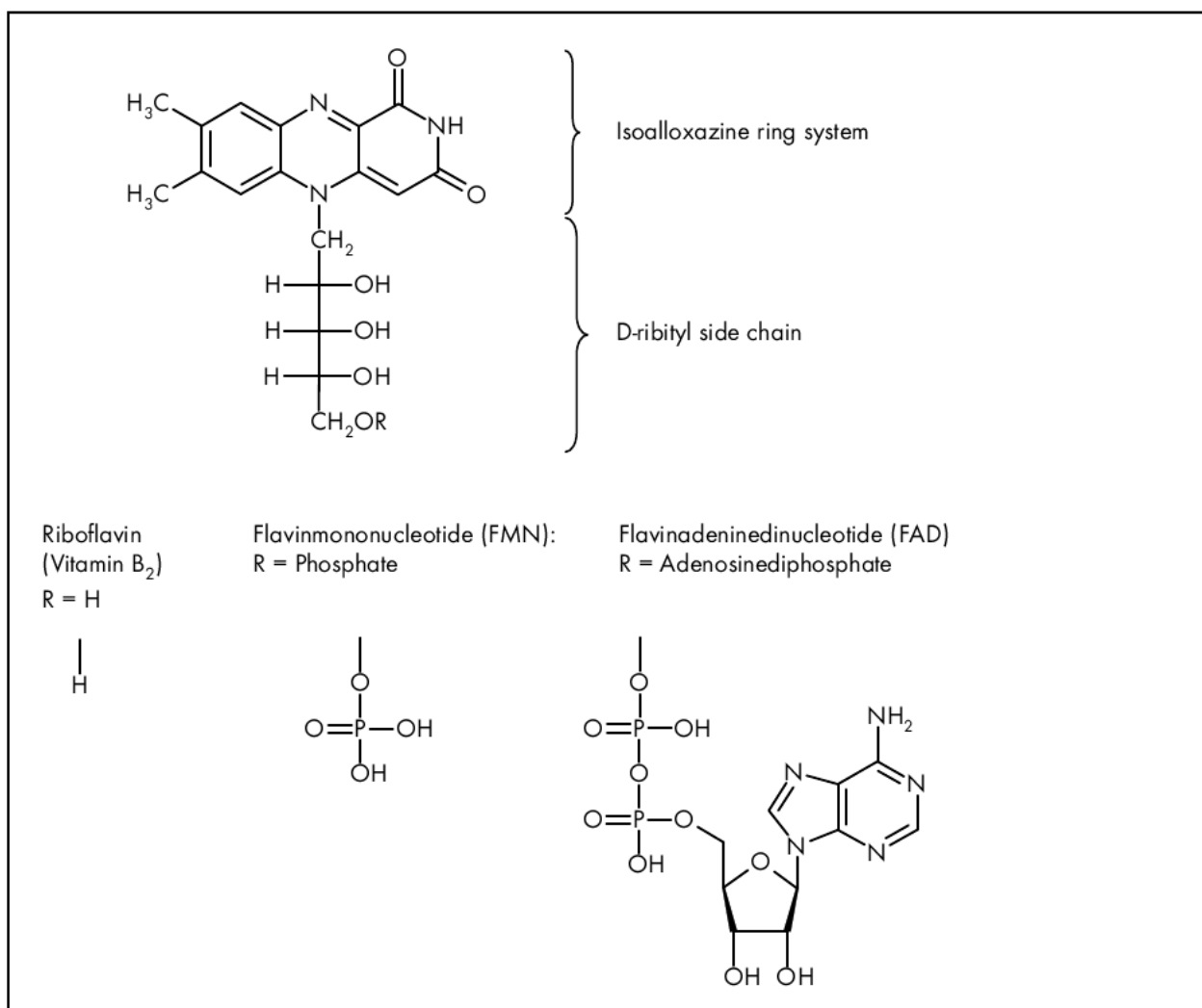


Fig. 1 – estrutura química da Vitamina B₂ e seus metabólitos ativos.

Origem

A Riboflavina é um componente de todas as células animais e vegetais. Fontes ricas em vitamina B₂ são, por exemplo, leite, fígado, levedura e germe de trigo. A vitamina B₂ de alimentos de origem animal é mais facilmente absorvida pelo organismo humano. Parte da recomendação diária é atendida por meio da síntese realizada por bactérias intestinais.

Metabolismo

Além da Riboflavina livre, as coenzimas FAD e FMN, que são geralmente ligadas às proteínas, são ingeridas na dieta. FAD e FMN são dissociados das suas proteínas durante o processo de degradação pelas enzimas digestivas, então são hidrolisadas a riboflavina por fosfatases e finalmente absorvidas no intestino delgado. A re-conversão da Riboflavina nas coenzimas FMN e FAD ocorre no citoplasma de vários tecidos diferentes (intestino delgado, fígado, rim, coração). O excesso da Riboflavina que não está ligado à proteína não pode ser armazenado e é excretado rapidamente na urina pelos rins.

Deficiência

A deficiência da Riboflavina ocorre em países ocidentais industrializados, e até principalmente combinada com a deficiência de outras vitaminas (nicotinamida, ácido fólico, ácido pantotênico). Os fatores causais como abuso do álcool e fototerapia em crianças contribuem para a deficiência. Os sintomas da deficiência de riboflavina são principalmente inflamações na pele, membranas mucosas e sabugo das unhas assim como fotofobia, queimadura dos olhos e alterações da conjuntiva.

Análise

Uma vez que ambas as coenzimas FAD e FMN são biologicamente importantes, a avaliação do status de vitamina B₂ no paciente por cromatografia líquida de alta eficiência deve incluir todos os componentes da riboflavina (FAD, FMN, riboflavina). Só assim é possível fazer a distinção entre os componentes de vitamina B₂ fisiologicamente ativos (FAD e FMN) e o fisiologicamente inativo riboflavina.

Uso específico:

O kit reagente Chromsystems Vitamina B2 em sangue total é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* a ser utilizado em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de riboflavina e seus metabólitos ativos FAD e FMN em amostras de sangue total de pacientes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit de vitamina B2 é um teste para pacientes com suspeita de deficiência de vitamina B2.

Princípio do kit:

Este método permite a simples, rápida e específica determinação de vitamina B₂ e seus metabólitos ativos em sangue total usando um sistema isocrático HPLC. Devido à sua fluorescência natural, os analitos podem ser detectados diretamente, sem derivatização. O preparo da amostra se restringe a um único passo de precipitação após a adição do tampão de extração seguido da estabilização dos analitos. Uma coluna HPLC dedicada e fase móvel otimizada especificamente para esta separação garantem confiabilidade e segurança na quantificação dos analitos.

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 de fluorescência é o requerido para a análise de vitamina B₂ (FAD, FMN, riboflavina). Frits de metal na conexão de entrada da bomba não são necessárias. O uso de degaseificador de solventes previne a formação de bolhas de ar e garante linha de base estável.

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	50 µL,
Tempo de corrida:	aproximadamente 9 min, o compartimento deve ser protegido da luz.
Razão de fluxo:	1,2 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (aprox. 20°C)
Detector fluorescência:	EX 465 nm, EM 525 nm
Solução de limpeza do injetor:	Água ultrapura (Grau HPLC) com no máximo 5% de metanol

3.2 Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise da vitamina B₂ é fornecida equilibrada e testada, e está pronta para uso. **Não deve ser lavada com nenhuma outra solução.** A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 1,2 mL/min é de cerca de 8,4MPa (84 bar) e pode elevar com a idade da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância.

Uma pré-coluna (no. ordem 17001 e 17037) é essencial para assegurar uma separação adequada dos analitos.

Antes de iniciar uma análise:

1. Lavar a coluna (a 1,2 mL/min) com aproximadamente 30 mL de fase móvel
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 1,2 mL/min por aproximadamente 15 - 20 min, até que a linha de base esteja estabilizada;
3. Injetar o calibrador preparado repetidamente até que dois cromatogramas sucessivos apresentem 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, bombeie a fase móvel a numa razão de fluxo baixa (aprox. 0,2 mL/min) através do sistema. A coluna HPLC permanece conectada, mas, para aumentar o tempo de vida da lâmpada, o detector deve ser desligado. 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 junção e o sistema HPLC limpo com cerca de 50 mL de H₂O/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra o tempo de retenção dos analitos com razão de fluxo de 1,2 mL/min:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
FAD	3,0
FMN	4,9
Riboflavina	7,9

A separação cromatográfica dura aproximadamente 9 min (veja cromatogramas no capítulo 12). Pequenas variações nos tempos de retenção podem ocorrer, por exemplo, devido a flutuações na temperatura.

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

O material utilizado é sangue total. Proteger as amostras da luz. Em frasco fechado, as amostras são estáveis por 1 dia entre +2 a +8°C. Amostras não analisadas imediatamente dentro de 1 dia devem ser mantidas abaixo de -18 °C.

Nota: É de responsabilidade individual de cada laboratório usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar os critérios de estabilidade específica para cada laboratório.

5.2 Reconstituição do calibrador em sangue total

O calibrador (artigo 37008) é rastreável a substância de referência adquirida 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 HPLC. **Para reconstituir o calibrador liofilizado em sangue total, pipetar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até a reconstituição completa. 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 sangue total 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 cerca de 1 dia quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Para períodos maiores aliquotar e armazenar. O calibrador reconstituído tem a vida útil de 3 meses quando armazenado abaixo de -18°C.

5.3 Reconstituição dos controles em sangue total

Os controles em sangue total (artigo 0033, 0034, 0035), 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 em cada um dos frascos.** 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 sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV1+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 cerca de 1 dia quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Para períodos maiores aliquotar e armazenar. O controle em sangue total reconstituído tem a vida útil de 3 meses quando armazenado abaixo de -18°C.

5.4 Procedimento de preparo das amostras

Reconstituir o calibrador em sangue total com 1,0 mL e cada controle em sangue total com 2,0 mL de água destilada (Ver capítulos 5.2 e 5.3)

1. Num frasco de reação âmbar, pipetar e agitar imediatamente por 30 s (vórtex):

- 200 µL de sangue total de amostra (ou calibrador/ controle reconstituído)
- + 200 µL de Tampão de Extração
- + 400 µL de Reagente de Precipitação

2. Centrifugar por 10 min a 9.000 rpm no mínimo.
3. Pipetar 100 µL do Tampão de Neutralização em um vial âmbar para amostrador automático, e então adicionar 500 µL do sobrenadante e homogeneizar bem (vortex)
4. Injetar 50 µL desta mistura no sistema HPLC.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

De acordo com as instruções descritas no capítulo 5.4, as amostras protegidas de luz (vial âmbar para amostrador automático) são estáveis à temperatura ambiente durante 24 horas, a 2-8 ° C durante 7 dias. Para um armazenamento prolongado (máx.. 2 semanas) as amostras preparadas têm que ser armazenadas abaixo de -18 ° C.

6 Resultados e avaliação

Calibração do sistema de análise

A concentração real dos analitos no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto informativo que acompanha os calibradores. Antes de iniciar a análise quantitativa das amostras dos pacientes, recomenda-se que seja executado um cromatograma de calibração. Para este propósito, injete repetidamente o calibrador preparado, até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção, resolução de pico e áreas/alturas de pico praticamente idênticos. Esses cromatogramas podem ser usados para definir os parâmetros de integração corretamente. O cromatograma da última injeção de teste é utilizado para calibrar o sistema de análise de dados (software para PC, integrador). Insira os tempos de retenção obtidos e a concentração do calibrador (ver folheto informativo anexo) na tabela de avaliação:

Nº do Pico	Analito	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)	Concentração (µg/L)
1	FAD	Aprox. 3,0 min ± 0,3 min	Veja folheto de informações
2	FMN	Aprox. 4,9 min ± 0,4 min	Veja folheto de informações
3	Riboflavina	Aprox. 7,9 min ± 0,7 min	Veja folheto de informações

Nota:

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 "External One-point Calibration" como método de integração no sistema de integração. Para avaliar se as análises tiveram desempenho correto, os controles (artigo 0033, 0034, 0035) devem ser incluídos a cada série de testes.

7 Controle de Qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Controles em sangue total, artigo 0034, 0035). 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

A seguinte faixa de referência foi retirada da literatura [6].

Analito	Faixa de Referência [$\mu\text{g/l}$]
Flavinadeninad nucleotídeo (FAD)	137-370

9 Fatores de Conversão

A tabela a seguir lista os fatores de conversão entre massa e concentração molar e concentração molar e massa.

Analito	$\mu\text{g/L}$ para nmol/L	nmol/L para $\mu\text{g/L}$
FAD	x 1,273	x 0,7856
FMN	x 2,192	x 0,4563
Riboflavina	x 2,657	x 0,3764

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
Tampão de Extração	+18 a + 30°C
Reagente de Precipitação	+18 a + 30°C
Tampão de Neutralização	+18 a + 30°C
Padrão de Calibração em Sangue Total	abaixo de -18 °C
Controles em Sangue Total	abaixo de -18 °C

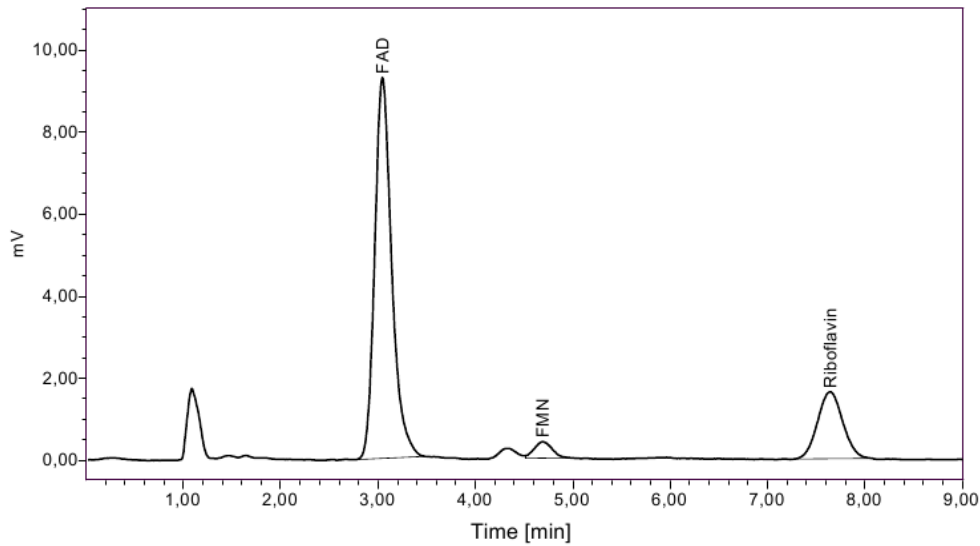
Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2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

11 Descarte de resíduos

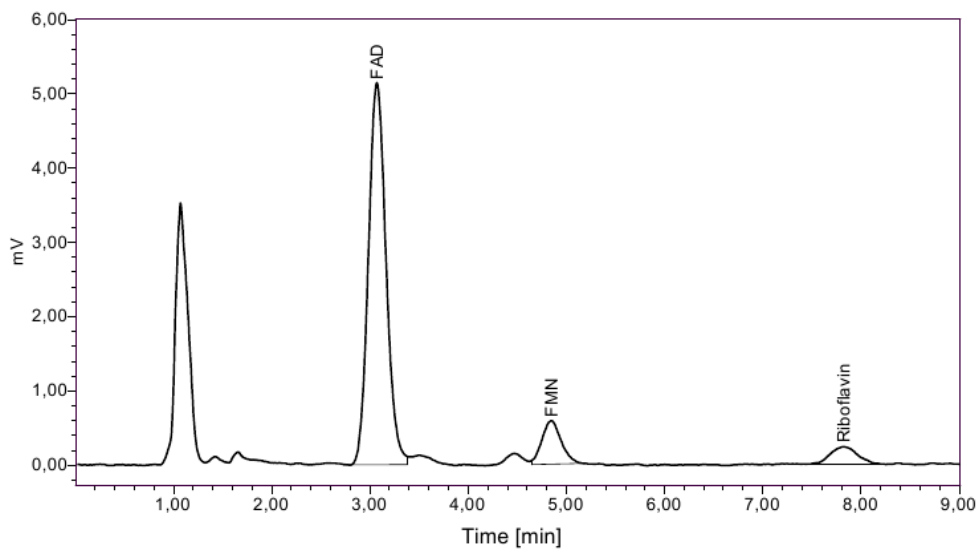
A Fase Móvel contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes livres de halogênio. O Reagente de Precipitação e os resíduos dos espécimes preparados contêm ácido forte. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas. As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com as diretrizes da 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 calibrador em sangue total



12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



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
	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
Linha de base instável	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
	Ar no sistema	Desgaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
Picos interferentes	Ar no sistema	Desgaseificar a fase móvel
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol
	Sistema de injeção contaminada	Limpar a seringa com metanol
	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Amostras não armazenadas adequadamente	Utilizar amostras recentes
Alargamento de picos, cauda	Coluna HPLC velha	Substituir a 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 pulsação da bomba	Avaliar bomba do HPLC
	Sistema não está equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos

14 Literatura

1. Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse, Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh (1997)
2. Isler O., Brubacher G., Ghisla S., Kräutler B., Vitamine II (2nd edition), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)
3. Greiling, H Gressner A.M. (Editor), Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag, Stuttgart (1987)
4. Baltes W., Lebensmittelchemie (2nd edition), Springer Verlag, Berlin (1989)
5. Friedrich W., In: Vitamins, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1988)
6. Fidanza F. et al: Comparison of methods for thiamin and riboflavin nutriture in man, Internat. J. Vit. Nutr. Res., 59: 40-47 (1989)

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 37011, 37022)   	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. H301+H311+H311 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos sérios aos órgãos. P210 Mantenha distante de 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+310 Em caso de ingestão: procurar assistência médica imediatamente. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lavar abundantemente com água e sabão. P403+P233 Manter em lugar bem ventilado. Manter bem fechado.
Reagente de Precipitação (artigo 37007)   	Perigo H314 Causa queimaduras severas e danos aos olhos. H335 Pode causar irritação respiratória. H411 Tóxico a organismos aquáticos, pode causar efeitos adversos de longa duração ao meio aquático. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P273 Evite descarte no ambiente. 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. P309+P311 Em caso de acidente ou mal-estar, procurar auxílio médico imediatamente, de preferência levar o rótulo. P301+P330+P331 Em caso de inalação: lave a boca. Não induza ao vômito.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Tampão de extração (artigo 37005) Tampão de neutralização (artigo 37099) Padrão de calibração em sangue total (artigo 37008) Controles em sangue total (artigo 0033, 0034, 0035)	

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	= $A_{\text{Calibrador}}$
Concentração C do analito A no calibrador	= $C_{\text{Calibrador}}$

A concentração do analito A na amostra C_{Amostra} é então calculada como a seguir:

$$C_{\text{Amostra}} [\mu\text{g/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Calibrador}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Apêndice III: Verificação

Para verificar a linearidade e validar o método, amostras de sangue total foram fortificadas com quantidades definidas de FAD, FMN e riboflavina. 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 sangue total fortificadas e de diluições de soluções padrão:

FAD	106%
FMN	100%
Riboflavina	108%

Linearidade e limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação determinado até o limite superior estabelecido:

Analito	Limite de quantificação (µg/L)*	Limite máximo de linearidade (µg/L)
FAD	3	1000
FMN	1	500
Riboflavina	2	500

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada pela média de 3 concentrações de variação de múltiplos preparos (n=10) em uma mesma amostra.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
	n = 10	n = 10	n = 10
FAD	0,8 (121)	1,4 (365)	1,6 (164)
FMN	2,3 (4,38)	3,0 (6,96)	1,9 (7,16)
Riboflavina	2,1 (8,48)	1,4 (27,1)	1,9 (17,5)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir da variação de múltiplos preparos e determinação da concentração do analito em *pool* de sangue total em 10 diferentes séries de testes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)	
	n = 100	n = 100
FAD	2,3 (120)	2,5 (359)
FMN	5,9 (4,30)	5,8 (6,81)
Riboflavina	5,6 (8,08)	5,2 (25,7)

Apêndice IV: Declaração de Conformidade

CHROMSYSTEMS

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: Vitamin B2
Nomenclature code: 12-07-02-02-00
Classification: other product

Product name: **Vitamin B₂ in Whole Blood**
Controls: **Vitamins B₁/B₂ Whole Blood Control**

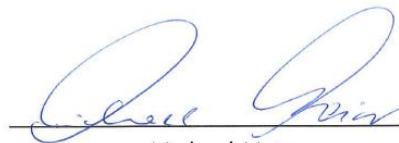
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

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 980, EN 23640,
EN 13641

Notified body: -

Munich, November 07, 2012



Michael Meier
General Manager

Vers. 2.1

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing /Germany

Telefon: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199

mailbox@chromsystems.de
www.chromsystems.de



Zertifiziert nach: DIN EN ISO 9001,
DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CADR