

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

KNOCHENSTOFFWECHSELMARKER

OSTEOPOROSIS DIAGNOSIS

DIAGNOSTIC DE L'OSTÉOPOROSE

DIAGNOSI DI OSTEOPOROSI

DIAGNÓSTICO DE OSTEOPOROSIS

Manual de Instrução para Análise em HPLC de
25-OH-Vitamina D₃/D₂ em soro/plasma

uso em diagnóstico *in vitro*

Artigo 38038

CE

**VITAMINAS D₂/D₃ EM SORO/ PLASMA – HPLC
25-OH-VITAMIN D3 / D2 IN SERUM / PLASMA - HPLC
MS 10350840162**

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	7
5.3	Reconstituição dos controles	8
5.4	Procedimento de preparo das amostras	8
5.5	Estabilidade das amostras preparadas	9
6	Resultados e avaliação	9
6.1	Calibração do sistema de análise.....	9
6.2	Quantificação por padrão interno	9
7	Controle de Qualidade	10
9	Fatores de Conversão	10
10	Armazenamento e validade dos reagentes	10
11	Descarte de resíduos.....	11
12	Exemplos de cromatogramas	12
12.1	Cromatograma de um calibrador em soro	12
12.2	Cromatograma de uma amostra de paciente com nível normal de 25-OH-vitamina D ₃	12
12.3	Cromatograma de uma amostra de paciente após suplementação com vitamina D ₂	13
13	Interferentes conhecidos	13
14	Problemas e Soluções.....	14
15	Literatura.....	15
	Apêndice I: Informações de segurança	16
	Apêndice II: Cálculo manual	19
	Apêndice III: Validação	20
	Apêndice IV: Declaração de Conformidade	20

1 Informações para requisição

Nº da ordem	Produto	
38038	Kit reagente para determinação de 25-OH-vitamina D₃/D₂ em soro/plasma, por HPLC, para 100 análises.	
	Fase Móvel	1000 ml
	Padrão de Calibração em Soro (liof.)	5 X 2,0 ml
	Padrão Interno	5 ml
	Reagente de Precipitação	50 ml
	Tampão de Lavagem 1	200 ml
	Tampão de Lavagem 2	7,5 ml
	Tampão de Eluição	20 ml
	Colunas de Limpeza da Amostra	2 x 50 unidades
	Tubos de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades
	Componentes disponíveis separadamente:	
38031	Fase Móvel	1000 ml
38032	Fase Móvel	10 x 1000 ml
38033	Padrão de calibração em soro (liof.)	5 x 2,0 ml
38004	Padrão Interno	5 ml
38005	Reagente de Precipitação	50 ml
38006	Tampão de Lavagem 1	200 ml
38007	Tampão de Lavagem 2	7,5 ml
38009	Tampão de Eluição	20 ml
38008	Colunas para Limpeza da Amostra	50 unidades
33005	Tubos de reação, âmbar (proteção contra luz)	100 unidades
	Acessórios	
38130	Coluna HPLC para análise de 25-OH-Vitamina D ₃ /D ₂ em soro/plasma (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna	1 unidade
18038	Cartucho de pré-coluna	1 unidade
	Calibradores e Controles para 25-OH-Vitamina D₃/D₂ em soro/plasma (liofilizado)	
62028	Conjunto de Calibradores em Soro 3PLUS1® MultiNível	4 x 1,0 ml
38033	Padrão de Calibração em Soro	5 x 2,0 ml
0028	Controle Bi-nível (I + II) de 25-OH-Vitamina D ₃ /D ₂ em soro	2 x 5 x 1,0 ml
0029	Controle Nível I de 25-OH-Vitamina D ₃ /D ₂ em soro	5 x 1,0 ml
0030	Controle Nível II de 25-OH-Vitamina D ₃ /D ₂ em soro	5 x 1,0 ml

2 Introdução

Vitamina D é o nome coletivo para um grupo de compostos lipossolúveis derivados da estrutura em anel do colesterol. As duas principais formas deste grupo são o colecalciferol (vitamina D₃, humanos e animais) e o ergocalciferol (vitamina D₂, plantas e fungos). Seus precursores são o 7-deidrocolesterol e o ergosterol, respectivamente.

O termo “vitamina” é de origem histórica. O colecalciferol que pode ser produzido na pele sob ação da radiação UV, não é uma vitamina no sentido verdadeiro, mas sim um pró-hormônio que é metabolizado até sua forma metabolicamente ativa – o calcitriol (1,25-(OH)₂-vitamina D₃). A dependência da exposição à luz solar explica o nítido comportamento sazonal da vitamina D no soro: no verão as concentrações de 25-OH-vitamina D₃ são muito mais elevadas que no inverno. Pela mesma razão, o tipo de pele influencia a biossíntese: indivíduos com pele escura (altos níveis de melanina) precisam cinco vezes mais tempo de exposição à luz solar em comparação aos de pele mais clara para produzir quantidades fisiologicamente suficientes de vitamina D.

Efeitos

A vitamina D é essencial na regulação da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo. A deficiência dessa vitamina leva à diminuição dos níveis de cálcio e alterações na mineralização óssea. Os sintomas associados são raquitismo (em crianças) e osteoporose (em adultos). Pacientes com deficiência de vitamina D mostram excreção elevada dos *crosslinks* de colágeno, o que é indicativo dos processos de reabsorção óssea.

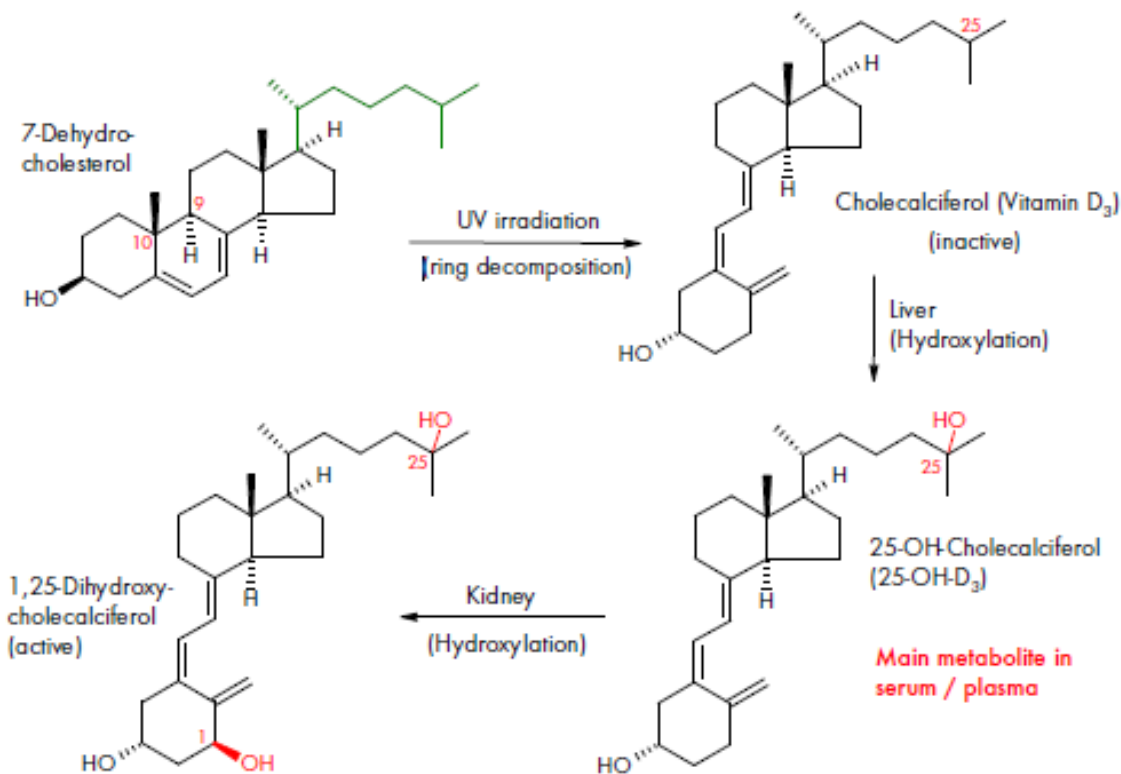
Além disto, a deficiência de vitamina D está associada ao risco elevado de algumas doenças crônicas como doenças autoimunes, doenças musculoesqueléticas, diabetes e alguns tipos de câncer e é considerada nas causas da hipertensão, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e renal.

Metabolismo

A vitamina D que é sintetizada na pele ou obtida da nutrição é metabolizada enzimaticamente no fígado até 25-OH-vitamina D₃ (25-hidroxi-colecalciferol, Calcidiol, fig. 1). Ela então se liga a uma proteína específica (DBP) para assim circular através do sistema sanguíneo. Este complexo representa a forma de armazenamento de vitamina D₃ e é o metabólito com maior concentração no soro. É também o parâmetro clínico bem estabelecido para diagnóstico da deficiência de vitamina D. A conversão da forma de armazenamento para a forma ativa é um processo hormonalmente regulado: o complexo proteína-25-OH-vitamina D₃ é transportado para os rins onde é hidroxilado por uma monooxigenase até 1,25-(OH)₂-vitamina D₃ (1,25-dihidroxi-colecalciferol, Calcitriol). Atualmente é reconhecido que uma grande variedade de outros tecidos também é capaz de produzir 1,25-(OH)₂-vitamina D. Aqui é regulada a proliferação celular, portanto, neutraliza o desenvolvimento do câncer. Além da 25-OH-vitamina D₃ e da 1,25-(OH)₂-vitamina D₃ existem mais de 30 metabólitos, a maioria deles inativos fisiologicamente.

Durante a suplementação com Vitamina D₂ (menos ativa), o intermediário clinicamente relevante 25-OH-vitamina D₂ (25-hidroxi-ergocalciferol) e o metabólito ativo 1,25-(OH)₂-vitamina D₂ derivam de vias de reação análogas. Em alguns países apenas a vitamina D₂ é licenciada para o tratamento da deficiência de vitamina D. Assim, é de especial importância a determinação de ambas as moléculas para evitar a avaliação incorreta do *status* de vitamina D.

Vitamin D₃ (animals and human)



Vitamin D₂ (plants and fungi)

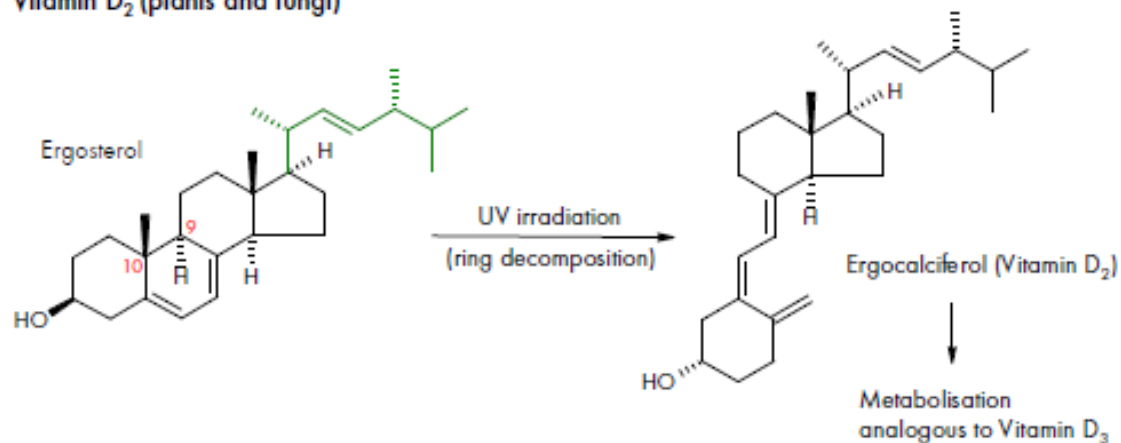


Figura 1: Biossíntese e metabolismo da Vitamina D.

Uso específico:

O kit de reagentes da Chromsystems para 25-OH-Vitamina D₃/D₂ em soro/plasma é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa dos principais metabólitos de vitamina D₃ e D₂, 25-hidroxicoilecalciferol e 25-hidroxiergocalciferol, em amostras de soro e plasma de pacientes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit é usado para avaliação de pacientes cujo nível de vitamina D requer monitoramento.

Princípio do kit:

Este kit permite a determinação cromatográfica simultânea e segura dos principais metabolitos das vitaminas D₃ e D₂, 25-hidroxicolecalciferol e 25-hidroxiergocalciferol num simples sistema HPLC isocrático com detecção UV. Por meio de uma eficiente precipitação de proteínas e seletiva extração em fase sólida, os interferentes são removidos e os analitos concentrados. Para quantificação precisa, um derivado estável da vitamina D é utilizado como padrão interno.

3 Sistema HPLC

3.1 Parâmetros do equipamento

A análise de 25-OH-vitamina D₃/D₂ em soro/plasma requer um sistema isocrático simples com bomba de HPLC, injetor e detector de UV. Não utilize um desgaseificador (a vácuo), pois isso pode alterar a composição da fase móvel. A utilização de um forno de coluna termostaticado evitará variações de temperatura e garantirá ótima estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	25 µL (10 - 50 µL)
Tempo de corrida analítica	12 min
Razão de fluxo:	0,7 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector UV:	265 nm
Solução de lavagem da agulha do injetor:	Acetonitrila/ água destilada (grau HPLC) = 1/1

3.2 Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise de 25-OH-vitamina D₃/D₂ 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 0,7mL/min é de cerca de 40-50 bar e pode elevar com a idade ou uso da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância. Para prolongar a vida útil da coluna, uma pré-coluna (artigo 18001 e 18038) pode ser utilizada.

Antes de iniciar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna HPLC, lavar o sistema com aproximadamente 50 mL de água ultrapura (grau HPLC) seguidos de 30 mL de fase móvel com razão de fluxo de 1,5 mL/min. E injetar cada solução várias vezes;
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 0,7 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 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, recircule a fase móvel 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 união 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 e padrão interno com razão de fluxo de 0,7 mL/min:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
25-OH-vitamina D ₃	4,2
25-OH-vitamina D ₂	4,6
Padrão Interno	7,1

A separação cromatográfica dura aproximadamente 12 min (veja cromatogramas no capítulo 12). Pequena variação nos tempos de retenção pode ocorrer, por exemplo, devido a flutuações na temperatura.

Se um novo lote de fase móvel é utilizado ou se a coluna é substituída, os tempos de retenção podem variar levemente e devem ser ajustados.

5 Preparo da amostra

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

Soro ou plasma é utilizado para análise. A estabilidade é de até 3 dias em temperatura ambiente e até 1 semana refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (no máximo 1 ano), armazenar abaixo de -18 °C [6]. É recomendado manter as amostras refrigeradas para o transporte.

Observação:

Não é recomendado o uso de tubos de coleta de sangue contendo separadores de gel para coleta de sangue. Alguns tipos de géis podem absorver os analitos e diminuir as suas concentrações nas amostras de soro. Alguns géis também podem causar picos interferentes.

Nota: É da responsabilidade de cada laboratório utilizar todas as referências disponíveis e/ou os seus próprios estudos para determinar critérios de estabilidade específicos para o seu laboratório.

5.2 Reconstituição do calibrador em soro

O calibrador (artigo 38033) é rastreável a substâncias de referência adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, os calibradores são submetidos ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. O calibrador preparado é utilizado para calibrar o sistema. **Para reconstituir o calibrador 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. Evitar exposição direta a luz solar! As concentrações atuais dependem do lote e serão encontradas no folheto de informações que acompanha os calibradores.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de um pool de soro humano testado e considerado não reativo contra anticorpos HIV 1+2, DNA de HIV, HCV e HBV (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao facto de não existir nenhum método de ensaio que dê garantia absoluta de que os produtos que contêm materiais de origem humana estarão isentos de agentes infecciosos, deve ser tido em conta um possível perigo de infecção. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos que contenham material de

origem humana como potencialmente infecciosos. Como consequência, tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador reconstituído:

O calibrador reconstituído é estável por 2 semanas quando mantido fechado, protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até no máximo 3 meses), fracionar e armazenar abaixo de -18 °C.

5.3 Reconstituição dos controles

Os controles em soro nível I (0029) e nível II (0030), são submetidos a todo o processo de preparo das amostras. Os controles são incluídos em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir os controles liofilizados, 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. Evitar 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 um pool de soro humano testado e considerado não reativo contra anticorpos HIV 1+2, DNA de HIV, HCV e HBV (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao facto de não existir nenhum método de ensaio que dê garantia absoluta de que os produtos que contêm materiais de origem humana estarão isentos de agentes infecciosos, deve ser tido em conta um possível perigo de infecção. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos. Como consequência, tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O controle reconstituído é estável por 2 semanas quando mantido fechado, protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até no máximo 3 meses), fracionar e armazenar abaixo de -18 °C.

5.4 Procedimento de preparo das amostras

Reconstituir o calibrador em soro (artigo 38033) e controles em soro (artigo 0029, 0030) com 2,0mL de água destilada (grau HPLC), ver capítulos 5.2 e 5.3.

O procedimento de preparo das amostras deve ser realizado sem interrupções!

1. Pipetar 500 µL de soro/plasma (ou calibrador, controles, amostras) e 50 µL de Padrão Interno num vial de reação protegido de luz, agitar brevemente.
2. Adicionar 500 µL do Reagente de Precipitação, agitar por 20 s (vórtex).
3. Incubar por 10 min a + 4 °C.
4. Centrifugar por 5 min a 15.000 x g.
5. Aplicar imediatamente todo o sobrenadante numa Coluna para Limpeza de Amostra rotulada e eluir por centrifugação (400 g cerca de 1 min) ou sucção; descartar o eluente.
6. Passar 2 x 1 mL de Tampão de Lavagem 1 pela coluna por centrifugação (400 g cerca de 1 min) ou sucção; descartar o eluente.
7. Passar 75 µL de Tampão de Lavagem 2 pela coluna por centrifugação (400 g cerca de 1 min) ou sucção; descartar o eluente.

8. Mudar o frasco de coleta, aplicar 200 µL do Tampão de Eluição e eluir completamente por centrifugação (400 g cerca de 1 min) ou sucção. **O eluente deve ser coletado em frasco de vidro!**
9. Diluir o eluato com 20 µL de água ultrapura (grau HPLC) e agitar.
10. Injetar 25 µL do eluato no sistema HPLC.

A precisão e exatidão das análises devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais a cada corrida analítica.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

Os eluatos/amostras preparadas são estáveis 1 semana em temperatura ambiente ou refrigeradas (+2 a +8°C) em frasco de vidro e protegidos da luz. Por períodos maiores (até 2 semanas) armazenar abaixo de -18 °C.

6 Resultados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

A concentração de 25-OH-vitamina D₃/D₂ no calibrador em soro 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.

Nº do Pico	Analito	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)	Concentração (mg/L)
1	25-OH-vitamina D ₃	4,2	Veja folheto de informações
2	25-OH-vitamina D ₂	4,6	- "
3	Padrão Interno	7,1	1

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 Avaliação quantitativa com 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 descrita como "1".**

7 Controle de Qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (artigos 0029, 0030).

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 concentração de 25-OH-vitamina D no soro depende de muitos fatores, p. ex. local de residência (latitude), estação, camada de ozônio, idade, sexo e pigmentação da pele. Por isso é difícil estabelecer um “intervalo normal”. As seguintes faixas são descritas na literatura [8]:

	Concentração no soro (µg/L)
Reserva de armazenamento suficiente	41-100
Reserva insuficiente	21-40
Suporte insuficiente	10-20
Deficiência	<10
Tóxico	>100

Normalmente, nenhuma quantidade significativa de 25-OH-vitamina D₂ está presente no soro de pacientes não suplementados.

9 Fatores de Conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
25-OH-vitamina D ₃	x 2,496	x 0,4007
25-OH-vitamina D ₂	x 2,423	x 0,4127

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 Lavagem 1	+ 18 a + 30°C
Tampão de Lavagem 2	+ 18 a + 30°C
Tampão de Eluição	+ 18 a + 30°C
Colunas para Limpeza de Amostra	+ 18 a + 30°C
Padrão de Calibração em Soro	abaixo de -18 °C
Controles Nível I e II em Soro	abaixo de -18 °C

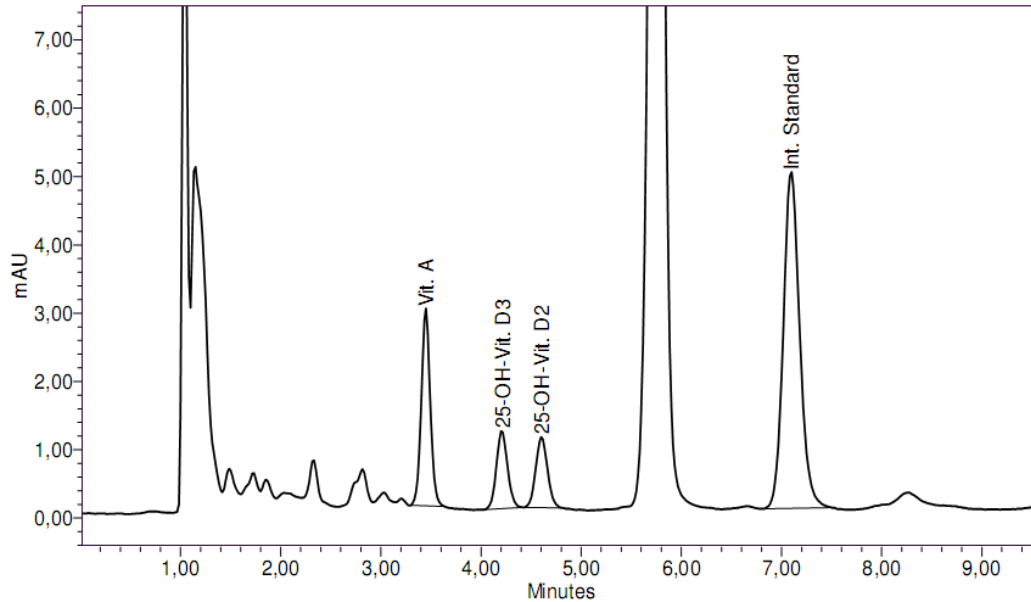
Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2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

11 Descarte de resíduos

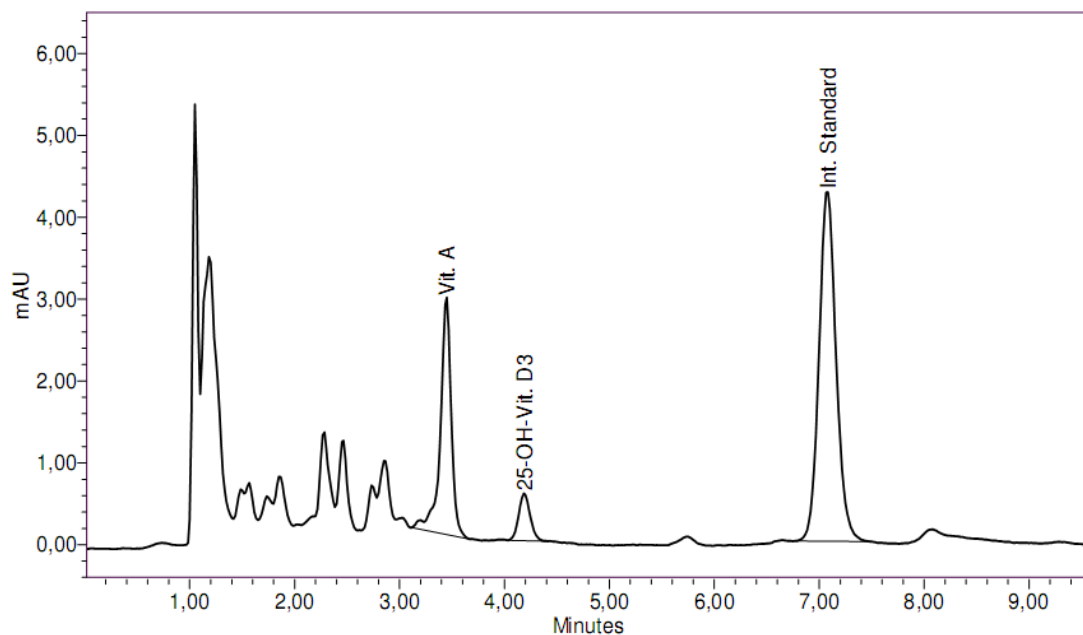
A Fase Móvel, o Padrão Interno, o Tampão de Lavagem 1, o Tampão de Lavagem 2 e o Tampão de Eluição contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes livres de halogênio. O Reagente de Precipitação e os resíduos dos espécimes preparados contêm solventes orgânicos e halogênios. Descarte os produtos dos resíduos em um contêiner para solventes orgânicos que possuem halogênio. As soluções mencionadas não devem ser descartadas 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 calibrador em soro

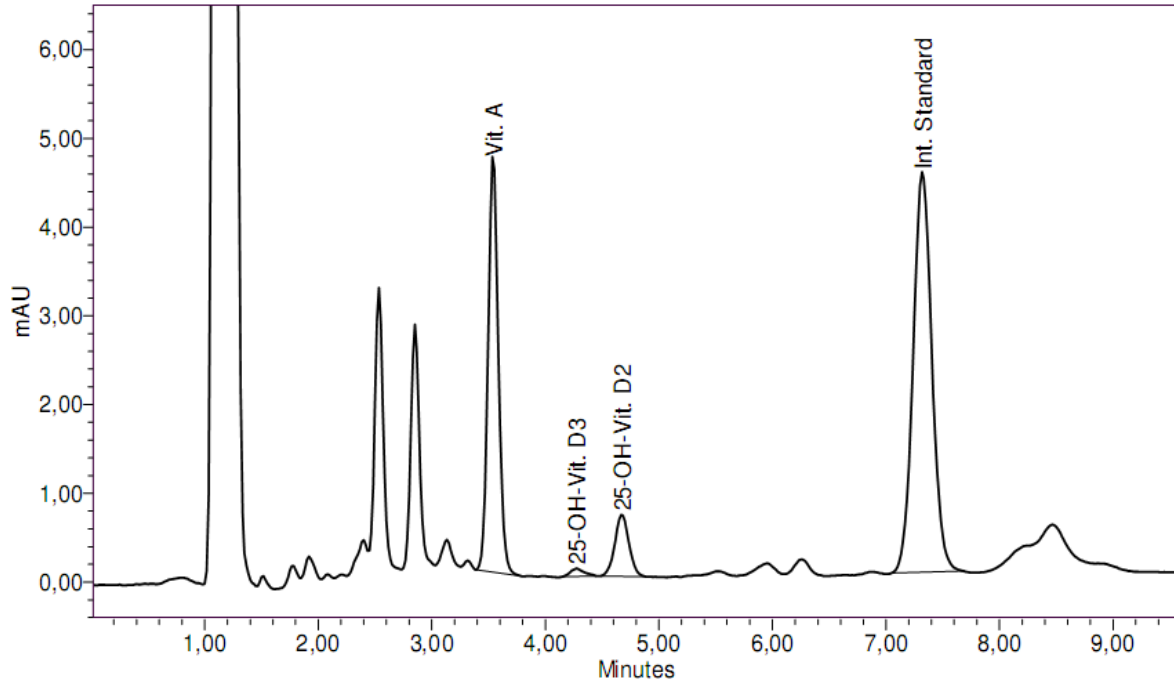


12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente com nível normal de 25-OH-vitamina D₃



25-OH-vitamin D₃: 38 µg/l

12.3 Cromatograma de uma amostra de paciente após suplementação com vitamina D₂



25-OH-vitamin D₃: 4.6 µg/l
 25-OH-vitamin D₃: 33.7 µg/l

13 Interferentes conhecidos

Favor observar:

Em algumas amostras de soro de recém-nascidos e crianças até 1 ano de idade, formas diastereoméricas (epímeros em C3) da 25-OH-vitamina D₃ e 25-OH-vitamina D₂ tem sido determinadas em concentrações significantes [7]. Para crianças mais velhas e adultos este fenômeno não tem sido observado. Este método não consegue distinguir as formas diastereoméricas citadas. Assim, a co-determinação dos epímeros em C3 pode em alguns casos levar a níveis falsamente elevados de 25-OH-vitamina D em recém-nascidos e crianças abaixo de 1 ano de idade.

14 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
Linha de base instável	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
Picos interferentes	Ar no sistema	Desgaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	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
	Seringa de injeção contaminada	Limpar a seringa com metanol
Alargamento de picos, cauda	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
	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





15 Literatura

1. Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H. Vitamin: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
2. Collins D, Jasani C, Folgeman I, Swaminathan R. (1998) Vitamin D and bone mineral density. *Osteoporos Int* **8**(2): 110-4.
3. Lips P. (2006) VitaminD Physiology. *Prog Biophys Mol Biol* **92**(1): 4-8.
4. Hart GR, Furniss JL, Laurie D, Durham SK. (2006) Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clin Lab* **52**(7-8): 335-43.
5. Goltzman D, Bikle DD, Drezner MK. (2006) Plenary symposium: Vitamin D: From Bench to Bedside. The American Society for Bone and Mineral Research, 28th Annual Meeting Webcast. <http://app2.capitalreach.com/esp1204/servlet/tc?c=10169&cn=asbmr&s=20337&&m=1&espmt=2&e=6867&espbr=16>
6. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Die Qualität diagnostischer Proben. Empfehlungen der arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 5. Aufl. BD Diagnostics Preanalytical Systems, Heideberg (2005).
7. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. (2006) C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(8): 3055-61.
8. Thomas L. Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books, Frankfurt/Main (2012).

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 38031, 38032)  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa irritação séria aos olhos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Use equipamentos eletrônicos/ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P243 Tome medidas de precaução a descarga estática.
Padrão Interno (artigo 38004)   	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Manter longe 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+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 38005)  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H315 Causa irritação na pele. H318 Causa irritação séria aos olhos. H335+H336 Pode causar irritação respiratória. Pode causar sonolência ou tontura. H412 Tóxico a organismos aquáticos, pode causar efeitos adversos de longa duração. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não

	<p>fumar. P261 Evita respirar a névoa/vapor/spray. 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. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P403+P233 Manter em lugar bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
<p>Tampão de Lavagem 1 (artigo 38006)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P210 Manter longe 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+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lavar abundantemente com água e sabão. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado</p>
<p>Tampão de Lavagem 2 (artigo 38007)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P210 Manter longe 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+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lavar abundantemente com água e sabão. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
<p>Tampão de Eluição (artigo 38009)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Perigoso por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa irritação ocular severa</p> <p>P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.</p>



P241 Utilize equipamento [elétrico/de ventilação/de iluminação] à prova de explosão.
P243 Tomar medidas para evitar descargas estáticas.
P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.

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

Calibrador multinível 3PLUS1® em soro (artigo 62028)
Padrão de calibração em soro (artigo 38033)
Controles em soro (artigo 0028, 0029, 0030)

Apêndice II: Cálculo manual

Cálculo usando o Padrão de Calibração em soro

Para o cálculo manual do resultado da análise usando o padrão de calibração em soro (artigo 38033) 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_{Amostra} é então calculada como a seguir:

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

Cálculo usando o Calibrador Multinível em soro 3PLUS1®

Para o cálculo manual do resultado da análise usando o Calibrador Multinível em soro 3PLUS1 (artigo 62028) os quocientes de pico de altura da substância e do padrão interno plotados contra a concentração de cada substância produz uma curva de calibração por regressão linear. A equação resultante é aplicada para cada substância.

Para cálculo manual dos resultados das análises os seguintes dados são necessários:

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra	= A_{Amostra}
Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= IS_{Amostra}
Slope da curva de calibração	= a
Ponto de intersecção da curva de calibração	= b

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

$$C_{\text{Amostra}} [\mu\text{g/L}] = \frac{(A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Amostra}}) - b}{a}$$

Apêndice III: Validação

Para verificar a linearidade e validar o método, amostras de soro e plasma foram fortificadas com quantidades definidas de 25-OH-vitamina D₃/D₂. 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 soro fortificadas e de diluições de soluções padrão.

Analito	Recuperação (%)
25-OH-vitamina D ₃	86
25-OH-vitamina D ₂	87
Padrão Interno	79

Linearidade e limite inferior de quantificação (LLOQ):

O método é linear a partir do limite de quantificação até a pelo menos o limite superior indicado:

Analito	Limite de Quantificação* (µg/L)	Intervalo Linear até (µg/L)
25-OH-vitamina D ₃	1,4	250
25-OH-vitamina D ₂	1,1	250

*O limite de detecção depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio do método foi determinada em diversas concentrações por meio de múltiplas limpezas da mesma amostra:

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
	n = 10		
25-OH-vitamina D ₃	3,0 (24,9)	0,9 (58,9)	1,9 (89,9)
25-OH-vitamina D ₂	1,8 (22,6)	0,8 (57,5)	1,9 (84,3)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada em duas diferentes concentrações pela determinação do coeficiente de variação de amostras de *pool* de soro analisadas em 10 dias diferentes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)	
	n = 100	
25-OH-vitamina D ₃	3,3 (25,2)	2,3 (90,4)
25-OH-vitamina D ₂	4,6 (23,2)	1,9 (84,5)

COPY

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

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: 25-Hydroxyvitamin D
Nomenclature code: 12-06-03-10-00
Classification: other product

Product name: **25-OH-Vitamin D₃/D₂ in Serum/Plasma**
Controls: **25-OH-Vitamin D₃/D₂ 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 980, EN 13640,
EN 13641

Notified body: -

Munich, February 02, 2012



Michael Meier
Managing Director

Vers. 2.0

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

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

mail: info@chromsystems.de
www.chromsystems.de



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