

CHROMSYSTEMS

MONITORING VON OXIDATIVEM STRESS
MONITORING OXIDATIVE STRESS
SUIVI DU STRESS OXYDATIF
MONITORAGGIO DELLO STRESS OSSIDATIVO
MONITORIZACIÓN DEL STRESS OXIDATIVO



Manual de instruções para a análise por HPLC

Vitamina C em plasma/soro

somente para uso diagnóstico *in vitro*
N° de artigo 65065

CE 

VITAMINA C EM SORO/ PLASMA – HPLC
VITAMIN C IN PLASMA/SERUM HPLC
ANVISA: 10350840140

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acordo com as normas ISO 9001 e ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e distribuídos de acordo com a Normativa 98/79/CE sobre produtos sanitários para diagnóstico in vitro.

© **Este documento é protegido por direitos autorais. Todos os direitos reservados.**

Importado e Distribuído por: Biosys Ltda.

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
Brasil

Tel.: (21) 3907 2534
CNPJ: 02.220.795/0001-79
www.biosys.com.br

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

Tel.: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Índice.....	Página
1 Informação sobre o pedido.....	3
2 Introdução.....	4
2.1 Informação geral.....	4
2.2 Finalidade pretendida.....	4
2.3 Princípio do kit de reagentes.....	5
3 Sistema HPLC.....	5
3.1 Equipamento e parâmetros do equipamento.....	5
3.2 Coluna de HPLC.....	5
3.3 Pausas no funcionamento.....	6
4 Separação cromatográfica.....	6
5 Preparo da amostra.....	7
5.1 Coleta e estabilidade das amostras dos pacientes.....	7
5.2 Reconstituição do padrão de calibração.....	7
5.3 Reconstituição dos controles.....	8
5.4 Processo de preparo de amostras.....	9
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.....	10
7 Controle de Qualidade.....	10
8 Valores de referência.....	10
9 Fatores de Conversão.....	10
10 Armazenamento e validade dos reagentes.....	10
11 Descarte de resíduos.....	11
12 Exemplos de cromatogramas.....	11
12.1 Cromatograma de um calibrador de Vitamina C.....	11
12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente.....	12
13 Interferências.....	12
14 Problemas e Soluções.....	14
15 Literatura.....	15
Anexo I: Informações de segurança.....	16
Anexo II: Notas sobre o cálculo manual.....	16
Anexo III: Verificação de dados.....	18
Anexo IV: Declaração de conformidade.....	19
Anexo V Símbolos.....	20

1 Informação sobre o pedido

Nº de artigo	Produto	
65065	Kit de reagentes por HPLC Vitamina C em plasma/soro	
	Conteúdo do kit para 100 análises: Fase Móvel 1000 ml	
	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 0,5 mL (liof.)
	Padrão Interno	10 mL
	Frascos de Reação, cor âmbar (proteção contra a luz)	100 unidades
	Componentes individuais	
65001	Fase Móvel	1000 ml
65002	Fase Móvel	10 x 1000 ml
65003	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 0,5 ml (liof.)
65044	Padrão Interno	10 ml
33005	Frascos de Reação, cor âmbar (proteção contra a luz)	100 unidades
	Acessórios	
65100	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
18001	Suporte de Cartucho de Pré-coluna 4/10	1 unidade
18065	Cartucho de Pré-coluna 4/10	1 unidade
15009	Pré-filtro de PEEK, 5 µm	5 unidades
15010	Suporte do Pré-filtro de PEEK	1 unidade
	Padrão de calibração e controles da Chromsystems	
65003	Plasma Calibration Standard	5 x 0,5 ml (liof.)
0074	Plasma Control Bi-Level (I + II)	2 x 5 x 0,5 ml (liof.)
0075	Plasma Control Level I	5 x 0,5 ml (liof.)
0076	Plasma Control Level II	5 x 0,5 ml (liof.)

2 Introdução

2.1 Informação geral

A vitamina C (ácido ascórbico) pertence, junto às vitaminas B1, B2, B6, B12, biotina, niacina e o ácido pantotênico, ao grupo das vitaminas hidrossolúveis. Estruturalmente, a vitamina C é a γ -lactona do ácido 2-ceto-L-gulônico. Em soluções aquosas, a vitamina C está presente estabilizada em forma de endiol, que é a responsável do caráter ácido do ácido ascórbico. Dentro de um meio de pH neutro, a vitamina C está presente principalmente em forma aniônica e, pelo contrário, em meio de pH muito ácido, em forma de ácido protonado. A vitamina C é muito sensível à oxidação e forma um equilíbrio reversível com sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico. Este é hidrolisado irreversivelmente a ácido 2,3-dicetogulônico. O ácido 2,3-dicetogulônico é o ponto de saída da decomposição aeróbica da vitamina C; oxida-se, por último, a ácido treônico e ácido oxálico.

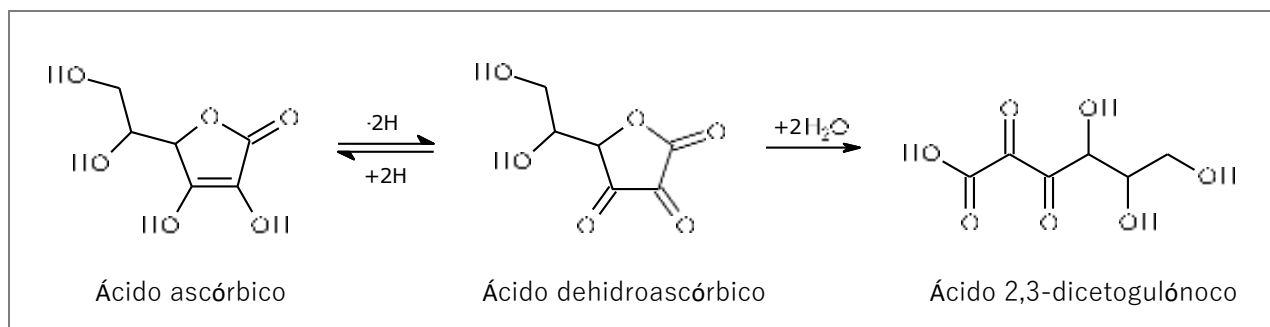


Figura 1: Vitamina C em equilíbrio com o ácido dehidroascórbico e a hidrólise a ácido 2,3-dicetogulônico

A vitamina C cumpre várias funções bioquímicas no organismo. É um antioxidante, protege dos radicais livres e das espécies de oxigênio reativo. O ácido ascórbico é capaz de evitar quase completamente a peroxidação lipídica, capturando os radicais hidrossolúveis. A vitamina C não é capaz de capturar os radicais lipossolúveis na membrana celular, não obstante, o ácido ascórbico regenera os radicais intermédios de vitamina E que se formam na peroxidação lipídica. Desta forma, as vitaminas C e E trabalham em sinergia, protegendo da peroxidação lipídica. Uma das funções bioquímicas mais importantes da vitamina C é seu aporte à síntese do colágeno. O ácido ascórbico participa na transferência de elétrons na hidroxilação da prolina em hidroxiprolina e da lisina em hidroxilisina. Estes dois elementos fazem um aporte decisivo à formação de uma estrutura helicoidal tripla, e assim, à estruturação espacial estável dos colágenos. Uma carência de vitamina C leva a uma estruturação defeituosa dos colágenos, e com isso ao quadro clínico do escorbuto.

A vitamina C também é responsável na formação de neurotransmissores. O ácido ascórbico é um cofator da dopamina- β -hidroxilase na hidroxilação de dopamina a noradrenalina. A vitamina C também cumpre um papel importante na desintoxicação de metabólitos tóxicos. Supõe-se que o ácido ascórbico estimula a síntese de citocromo P450, e com isso as defesas imunológicas do corpo. Um amplo número de estudos epidemiológicos indica que a vitamina C protege da carcinogênese.

2.2 Finalidade pretendida

O kit de reagentes Vitamina C em plasma/soro é um produto de diagnóstico *in-vitro* para uso em laboratórios clínicos que se destina para a análise quantitativa de vitamina C em amostras de plasma e soro de pacientes por meio da cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) com detecção UV. Este kit se usa com aqueles pacientes que requeiram um acompanhamento de seus níveis de vitamina C.

2.3 Princípio do kit de reagentes

Este kit de reagentes de Chromsystems permite a análise cromatográfica confiável de vitamina C em um processo de HPLC isocrático com detecção UV. Uma efetiva precipitação proteica separa os componentes interferentes e estabiliza a vitamina C ao mesmo tempo. Para uma quantificação segura se utiliza um padrão interno estável. Graças a uma estabilização especial das amostras preparadas é possível processar sequências longas de amostras de forma confiável.

3 Sistema HPLC

Atenção:

No manuseio dos reagentes, prestar atenção às observações sobre as substâncias perigosas mencionadas no anexo I.

3.1 Equipamento e parâmetros do equipamento

Para a análise da vitamina C é necessário um sistema isocrático simples com bomba de HPLC, injetor e detector UV. Usar um forno de colunas termostaticado para evitar variações na temperatura e otimizar a estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

Configurações do aparelho:

Injetor automático:	volume de injeção 20 µl Recomenda-se refrigerar as amostras
Duração das análises:	5 min aprox.
Velocidade de fluxo:	1,5 mL/min
Temperatura da coluna:	temperatura ambiente (25 °C aprox.)
Detector UV:	comprimento de onda de medição 245 nm
Fluído de lavagem da agulha para o injetor:	água

3.2 Coluna de HPLC

A coluna HPLC para a análise da vitamina C é enviada equilibrada e testada, pronta para uso. **Não deve ser lavada com outras soluções.** Com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min, a contrapressão de uma coluna nova é de aproximadamente 140 bar, e pode aumentar levemente com o tempo. Enquanto as separações forem satisfatórias, o aumento da pressão não é relevante. Para aumentar a durabilidade da coluna recomenda-se o uso de um pré-filtro (nº de artigo 15009 e nº 15010) ou uma pré-coluna (nº de artigo 18065 y 18001).

Antes de iniciar a série de análises:

1. Antes de montar a coluna de HPLC, lavar o equipamento primeiro com 50 mL de água ultrapura (grau HPLC), com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min, seguida de uma lavagem com 50 mL de fase móvel.
2. A seguir, montar a coluna e equilibrar o sistema até que se estabilize a linha de base, aproximadamente uns 10 min com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min.

3. Injetar depois várias vezes o padrão de calibração processado até que dois cromatogramas consecutivos sejam idênticos em seus tempos de retenção e áreas ou alturas de pico.
4. Recircular a fase móvel.

3.3 Pausas no funcionamento

Se o equipamento não vai ser usado durante no máximo três dias, recomenda-se manter a fase móvel em circulação com uma velocidade de fluxo reduzida (0,2 mL/min), para evitar a cristalização de sais nas tubulações do êmbolo da bomba de HPLC. A coluna de HPLC deve permanecer conectada ao sistema. Desconectar o detector para preservar a lâmpada. Para interrupções mais prolongadas, desmontar a coluna de HPLC e montar em seu lugar uma peça de conexão. **Não é necessário realizar um procedimento de conservação ou de lavagem para a coluna. Conserve a coluna na fase móvel (a temperatura ambiente).** A seguir, lavar o sistema de HPLC com 50 mL de água/metanol = 90/10.

4 Separação cromatográfica

A seguinte tabela contém os tempos de retenção dos analitos a uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min.

Tabela 1: Tempos de retenção

Substância	Tempo de retenção (aprox. min)
Vitamina C	2,2
Padrão Interno	2,7
Ácido Úrico	4,3

A duração da separação cromatográfica é de 5 min. aproximadamente, com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min. Pequenas oscilações nos tempos de retenção podem ser provocadas por mudanças de temperatura.

5 Preparo da amostra

Atenção:

No manuseio dos reagentes, prestar atenção às observações sobre as substâncias perigosas mencionadas no anexo I.

5.1 Coleta e estabilidade das amostras dos pacientes

Utilizar plasma colhido com heparina de lítio, plasma colhido com heparina de sódio ou soro recém coletado como material de análise. Outros sistemas de coleta de sangue têm uma estabilidade menor para analisar a vitamina C.

Atenção:

Não use plasma hemolítico, já que existe o risco de medir valores muito baixos.

A vitamina C no plasma de heparina se conserva como se indica a seguir:

Tabela 2: Estabilidade das amostras dos pacientes (plasma de heparina)

Temperatura de armazenamento	Estabilidade
a menos de -18 °C	2 dias
a menos de -70 °C	14 dias

A obtenção do plasma deve ser realizada na maior brevidade possível. As amostras devem ser enviadas congeladas, e ser submetidas ao processo de preparo de amostras imediatamente após seu descongelamento.

Nota:

É responsabilidade de cada laboratório fazer uso de todas as referências disponíveis e/ou de realizar estudos próprios para estabelecer os critérios de estabilidade específicos para seu laboratório.

5.2 Reconstituição do padrão de calibração

Antes de preparar as amostras, reconstitua o padrão de calibração de plasma (nº de artigo 65003) como se indica a seguir:

1. Pipetar 0,5 mL de água de alta pureza no recipiente original
2. Reconstituir entre 10 e 15 minutos a uma temperatura de +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Verificar que o conteúdo do recipiente seja homogêneo. Se ainda podem ser observadas substâncias sem dissolver, prolongar o tempo de reconstituição. Evitar a luz direta do sol.

Os valores dos padrões de calibração são rastreáveis à pesagem das substâncias puras. As concentrações dos analitos no padrão de calibração dependem do lote. Encontrará cada um dos valores no folheto de informação do padrão de calibração.

Atenção!

Este producto foi produzido a partir de um *pool* de plasma humano testado, pelo fabricante, para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B (VHB), o vírus da hepatite C (VHC) e a bactéria *Treponema pallidum*, sendo o resultado da análise negativo. No entanto, não se pode descartar totalmente um risco de infecção ao usar este produto. Considere todos os produtos que contenham materiais humanos como potencialmente infecciosos. Ao usar estes produtos tome as mesmas medidas de precaução que no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do padrão de calibração após a reconstituição:

O padrão de calibração dissolvido em água conserva-se como se indica a seguir:

Tabela 3: Estabilidade do padrão de calibração após a reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 até +8 °C	4 dias	protegido da luz, bem fechado
a menos de -18 °C	4 semanas	protegido da luz, bem fechado

5.3 Reconstituição dos controles

Antes de preparar as amostras, reconstitua os controles de plasma (nº de artigo 0075, 0076) como se indica a seguir:

1. Pipetar 0,5 mL de água de alta pureza no recipiente original
2. Reconstituir entre 10 e 15 minutos a uma temperatura de +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Verificar que o conteúdo do recipiente seja homogêneo. Se ainda podem ser observadas substâncias sem dissolver, prolongar o tempo de reconstituição. Evitar a luz direta do sol.

As concentrações dos analitos nos controles dependem do lote. Encontrará cada um dos valores no folheto de informação de cada controle.

Atenção!

Este producto foi produzido a partir de um *pool* de plasma humano testado, pelo fabricante, para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B (VHB), o vírus da hepatite C (VHC) e a bactéria *Treponema pallidum*, sendo o resultado da análise negativo. No entanto, não se pode descartar totalmente um risco de infecção ao usar este produto. Considere todos os produtos que contenham materiais humanos como potencialmente infecciosos. Ao usar estes produtos tome as mesmas medidas de precaução que no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade dos controles após a reconstituição:

Os controles dissolvidos em água se conservam como se indica a seguir:

Tabela 4: Estabilidade dos controles após a reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 até +8 °C	4 dias	protegido da luz, bem fechado
a menos de -18 °C	4 semanas	protegido da luz, bem fechado

5.4 Processo de preparo de amostras

1. Pipetar 100 µl de amostra (ou calibrador/controle) em um frasco de reação rotulado e protegido da luz.
2. Adicionar 100 µl de Padrão Interno e agitar 30 s em vórtex.
3. Centrifugar 5 min a um mínimo de 13 000 x g.
4. Transferir o sobrenadante para um vial de vidro para *autosampler* protegido da luz.
5. Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema de HPLC.

Controle de qualidade: Em cada série de análise se deve incluir controles para documentar a precisão e exatidão.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas para a determinação, seguindo as indicações do capítulo 5.4, se conservam como se indica a seguir:

Tabla 5: Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 até +25 °C	24 horas	protegido da luz, bem fechado, <i>vials</i> de vidro
+2 até +8 °C	1 semana	protegido da luz, bem fechado, <i>vials</i> de vidro
abaixo de -18 °C	6 semanas	protegido da luz, bem fechado, <i>vials</i> de vidro

6 Resultados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

A concentração de Vitamina C no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador. Antes de iniciar a análise quantitativa de amostras de pacientes, é recomendado correr um cromatograma de calibração. Para esta finalidade, 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. aprox.)	Concentração (mg/L)
1	Vitamina C	2,2	Veja folheto de informações
2	Padrão Interno	2,7	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. Para avaliação selecione "método padrão interno".

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 capítulo 12) para correta integração. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao calibrador e as amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser determinada como "1".

7 Controle de Qualidade

A precisão e exatidão podem ser monitorados pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Chromsystems Controles em plasma (artigo 0074, 0075, 0076). 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

Os valores de referência para vitamina C em plasma são dados na literatura:

Analito	Faixa de referência 1 [1]	Faixa de referência 2 [5]
Vitamina C	4,6 - 14,9 mg/L (26,1 - 84,6 μ mol/L)	4-15 mg/L (23 - 85 μ mol/L)

Um resumo da ingestão recomendada associada com a idade e mais detalhes sobre faixas de referência também podem ser encontradas na literatura [6].

9 Fatores de Conversão

Analito	mg/L para μmol/L	μmol/L para mg/L
Vitamina C	x 5,678	x 0,176

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 armazenamento indicadas no rótulo sejam obedecidas.

Tabela 8: Condições de transporte para o kit de reagentes:

Produto	Temperatura de transporte
Kit de reagentes (artigo 65065)	+18 a +30°C

Após o transporte armazenar como indicado abaixo:

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	+18 a + 30°C
Padrão Interno	+ 2 a + 8 °C
Padrão de Calibração em Plasma	abaixo de -18 °C
Controles nível I e nível II, em Plasma	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

O padrão interno contém um ácido forte. As soluções devem ser neutralizadas e descartadas em um recipiente para soluções salinas.

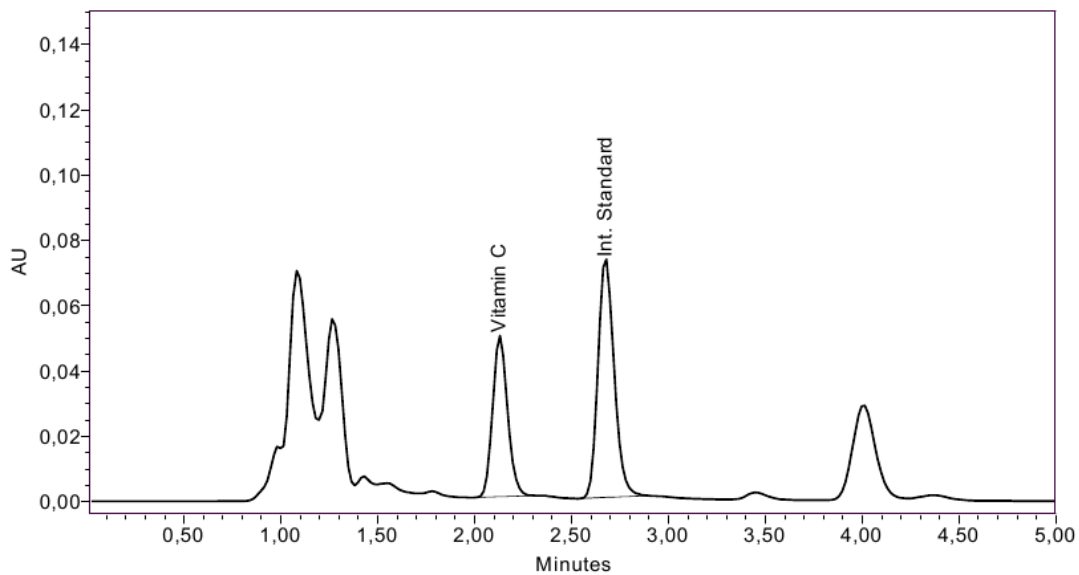
Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles e calibradores devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infecciosos.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. Os produtos não devem ser distribuídos para o abastecimento de água principal.

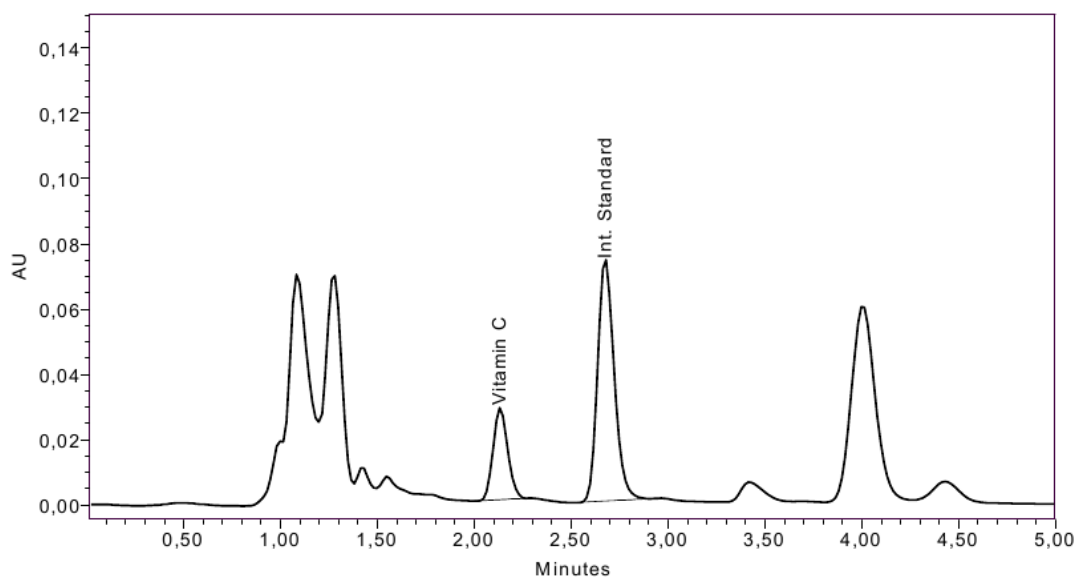
Resíduos de produtos devem ser descartados de acordo com a Diretiva 2008/98/CE sobre os resíduos e as exigências nacionais e locais. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e o acesso permitido somente a pessoas autorizadas.

12 Exemplos de cromatogramas

12.1 Cromatograma de um calibrador de Vitamina C



12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



Vitamina C: 9,3 mg/L

13 Interferências

Os seguintes medicamentos, comumente utilizados, foram testados para quaisquer interferências:

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, ampicilina, anlodipina, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, bisoprolol, captopril, carbamazepina, 10-carbamazepina, 11-epóxido,

cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacino, claritromicina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, disopiramida, enalaprilato, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, a hidroclorotiazida, ibuprofeno, dinitrato de isossorbida, itraconazol, cetoconazol, levofloxacino, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, a metformina, meticilina, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico, ácido micofenólico glucuronídeo, N- acetilprocainamida, nadolol, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, propanolol, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol, ácido salicílico, estreptomicina, sulfametoxazol, tramadol, triantereno, trimetoprim, ácido valpróico, vancomicina verapamil.

A acetilcisteína, na maior concentração terapêutica, interfere com o Padrão Interno fornecendo concentrações de vitamina C aproximadamente 30% mais baixa. Esta interferência pode ser detectada por um segundo pico na frente do pico do padrão interno. Avaliar essas amostras para esta interferência com exclusão do padrão interno.

Todas as outras substâncias examinadas apresentam influência negligenciável sobre os resultados quantitativos (desvio $\leq 15\%$).

Para questões relativas a possíveis interferências, contactar o seu representante local Chromsystems.

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
	Flutuação da temperatura	Usar forno de 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
	Cela do detector contaminada	Limpar a cela
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
	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
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
Sensibilidade diminuindo	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Cela do detector contaminada	Limpar a cela
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
Mudanças no tempo de retenção	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
	Razão de fluxo instável	Avaliar bomba do HPLC
	Sistema não está equilibrado	Injetar a fase móvel por cerca de 15 minutos do sistema; injetar o calibrador repetidamente
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 a lâmpada se necessário

15 Literatura

1. Lee W, Roberts SM, Labbe RF. (1997) Ascorbic acid determination with an automated enzymatic procedure. ClinChem 43(1): 154-7.
2. Greiling H, Gressner AM (Hrsg). Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Aufl, Schattauer Verlag Stuttgart (1995).
3. Nuhn P. Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. 2. Aufl, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1990).
4. Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H (Hrsg). Vitamine. Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1997).
5. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Band 1 - Klinische Chemie. 1. Aufl, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007).
6. Stahl A, Hesecker H. (2010) Vitamin C: Physiologie, Vorkommen, Analytik, Referenzwerte und Versorgung in Deutschland. Ernährungs-Umschau 03: 134-40

Anexo 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
Padrão Interno (artigo 65044)  	Perigo H272 Pode agravar incêndios; oxidante. H290 Pode ser corrosivo para metais. H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P280 Usar luvas de proteção / vestuário / proteção para os olhos / face. P305 + P351 + P338 EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Retirar as lentes de contato, se presentes e se possível. Continuar a enxaguar. P309 + P311 em caso de exposição ou se sentir indisposição: contate um centro especializado ou um médico. P301 + P330 + P331 EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Fase Móvel (artigo 65001, 65002) Padrão de calibração em plasma (artigo 65003) Controles em plasma (artigo 0074, 0075, 0076)	

Anexo II: Notas sobre o 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_{Amostra}) é então calculada como a seguir:

$$C_{\text{Amostra}} \text{ (mg/L)} = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Anexo III: Verificação de dados

Para verificar a linearidade e verificar o método, amostras de plasma foram fortificadas com quantidades definidas de vitamina C. Múltiplas alíquotas foram submetidas ao processo de preparação.

Recuperação:

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

Matriz	Taxa de Recuperação [%] Vitamina C	Taxa de Recuperação [%] Padrão Interno
Plasma	97	103
Soro	102	100

Linearidade e limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação determinado até a faixa de referência de Vitamina C até 100 mg/L.

Analito	Limite de quantificação (mg/L)	Limite máximo de linearidade (mg/L)
Vitamina C (Plasma)	0,4	100
Vitamina C (Soro)	0,4	100

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada pela média de três concentrações de múltiplas preparações (n=10) na mesma amostra.

Analito (Matriz)	Coeficiente de variação (%) (concentração em mg/L)		
	n = 10		
Vitamina C (Plasma)	2,2 (6,13)	3,1 (14,5)	3,3 (21,3)
Vitamina C (Soro)	2,0 (6,17)	3,8 (14,2)	0,9 (9,16)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de amostras de três pools de amostras diferentes estabilizadas que foram preparadas 5 vezes. A concentração de vitamina C foi medida em 20 séries de testes diferentes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em mg/L)		
	n = 100		
Vitamina C (Plasma)	4,6 (5,99)	3,4 (14,2)	4,8 (20,4)

Anexo 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
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 Vitamin Tests
Nomenclature code: 12-07-02-90-00
Classification: other product

Product name: **Vitamin C in Plasma/Serum**
Controls: **Vitamin C Plasma Control**

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

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

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

Notified body: -

Gräfelfing, July 03, 2015



Michael Meier
General Manager

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

Telefon: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199
info@chromsystems.de
www.chromsystems.de

Spaarkasse Schwandorf
(BLZ 750 510 40) Konto 100 112 275
BIC: BYLA01M15AD
IBAN DE18 7505 1040 0100 1122 75

Geschäftsführer:
Michael Meier
HRB München 92 351



Vers. 3.0
Zertifiziert nach:
DIN EN ISO 9001
DIN EN ISO 13485
ISO 13485 CBDR

Anexo V Símbolos

Em nossas etiquetas, manuais de instruções e embalagens usamos símbolos de conformidade com EN ISO 15223-1, cujo significado se descreve na seguinte tabela:

Tabela 16: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data de fabricação
	Data de validade
	Número de artigo
	Código de lote
	Seguir instruções de uso
	Limite superior de temperatura: Armazenamento abaixo de uma temperatura determinada
	Limite de temperatura: Armazenamento dentro de um intervalo determinado de temperatura
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Suficiente para <n> testes
	Número de série