

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

MONITORING VON OXIDATIVEM STRESS

MONITORING OXIDATIVE STRESS

SUIVI DU STRESS OXYDATIF

MONITORAGGIO DELLO STRESS OSSIDATIVO

MONITORIZACIÓN DEL STRESS OXIDATIVO



Manual de Instruções para Análise por HPLC:

Coenzima Q10 em Soro/Plasma/Sangue Total

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 68000

**COENZYME Q10 IN SERUM/PLASMA/WHOLE BLOOD
MS: 10350840268**

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 / 0800 015 1414– 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	Desligamento.....	7
4	Separação cromatográfica	7
5	Preparo da amostra.....	7
5.1	Coleta e armazenamento das amostras de pacientes	7
5.2	Reconstituição do plasma calibrador.....	7
5.3	Reconstituição do controle em plasma.....	8
5.4	Procedimento de preparo das amostras em plasma/soro	8
5.5	Procedimento de preparo das amostras em sangue total	9
5.6	Estabilidade das amostras preparadas	10
6	Resultados e avaliação	10
6.1	Calibração do sistema de análise.....	10
6.2	Avaliação Quantitativa com Padrão Interno	10
7	Controle de Qualidade	10
8	Valores de referência	11
9	Fatores de Conversão.....	11
10	Armazenamento e validade dos reagentes.....	11
11	Descarte de resíduos	12
12	Exemplos de cromatogramas.....	13
12.1	Cromatograma de um calibrador em plasma	13
12.2	Cromatograma de um controle em plasma	13
12.3	Cromatograma de uma amostra em soro.....	14
12.4	Cromatograma de uma amostra em sangue total	14
13	Problemas e Soluções	15
16	literatura	16
	Apêndice I: Informações de segurança.....	17
	Apêndice II: Cálculo Manual.....	19
	Apêndice III: Validação	20
	Apêndice IV: Declaração de Conformidade	21

Informações para requisição

Artigo	Produtos	
68000	Kit Reagente para análise por HPLC de Coenzima Q10 em Plasma, Soro e Sangue Total	
	Para 100 análises:	
	Fase Móvel	1000 ml
	Padrão Interno	25 ml
	Reagente de Precipitação 1	50 ml
	Reagente de Precipitação 2	10 ml
	Tampão de Lavagem 1	50 ml
	Tampão de Lavagem 2	16 ml
	Tampão de Eluição	25 ml
	Colunas de Amostras	2 x 50 unidades
	Tubos de Reação (protegidos da luz)	100 unidades
	Componentes disponíveis separadamente:	
68001	Fase Móvel	1000 ml
68002	Fase Móvel	10 x 1000 ml
68003	Padrão de Calibração em plasma (liofilizado)	5 x 2 ml
68004	Padrão Interno	25 ml
68005	Reagente de Precipitação 1	50 ml
68006	Reagente de Precipitação 2	10 ml
68007	Tampão de lavagem 1	50 ml
68009	Tampão de lavagem 2	16 ml
68010	Tampão de Eluição	25 ml
68008	Colunas de Amostras	50 peças
33005	Tubos de Reação (protegidos da luz)	100 peças
	Acessórios	
68100	Coluna HPIC, para análise de Coenzima Q10 em plasma, soro e sangue total (equilibrada, com cromatograma teste)	1 peça
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
18068	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça
	Controles (liofilizados)	
68003	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 2.0 ml
0091	Coenzyme Q10 Plasma Control, Bi-nível (I + II)	2 x 5 x 2 ml
0092	Controle em Plasma nível I	5 x 2.0 ml
0093	Controle em Plasma nível II	5 x 2.0 ml

2 Introdução

Coenzima Q10 (coenzima Q) pertence à classe das ubiquinonas ("quinonas ubíquos"), que pode ser produzido por quase todas as células vivas. Coenzima Q10 compreende um anel de quinona, o qual permite a transferência de elétrons na sua qualidade de grupo funcional, e uma cadeia lateral hidrofóbica, o que garante o correto posicionamento da molécula na membrana mitocondrial interna (figura 1). Uma vez que esta cadeia lateral compreende 10 unidades C5 de isopreno em mamíferos, a coenzima é referida como Q10. A molécula de ubiquinona pode aceitar dois elétrons e 2 prótons em várias etapas. Após a aceitação do primeiro elétron o radical relativamente estável, semiquinona, é formado. A forma reduzida, ubiquinole, é derivado do radical semiquinona depois de aceitar um elétron e mais dois prótons.

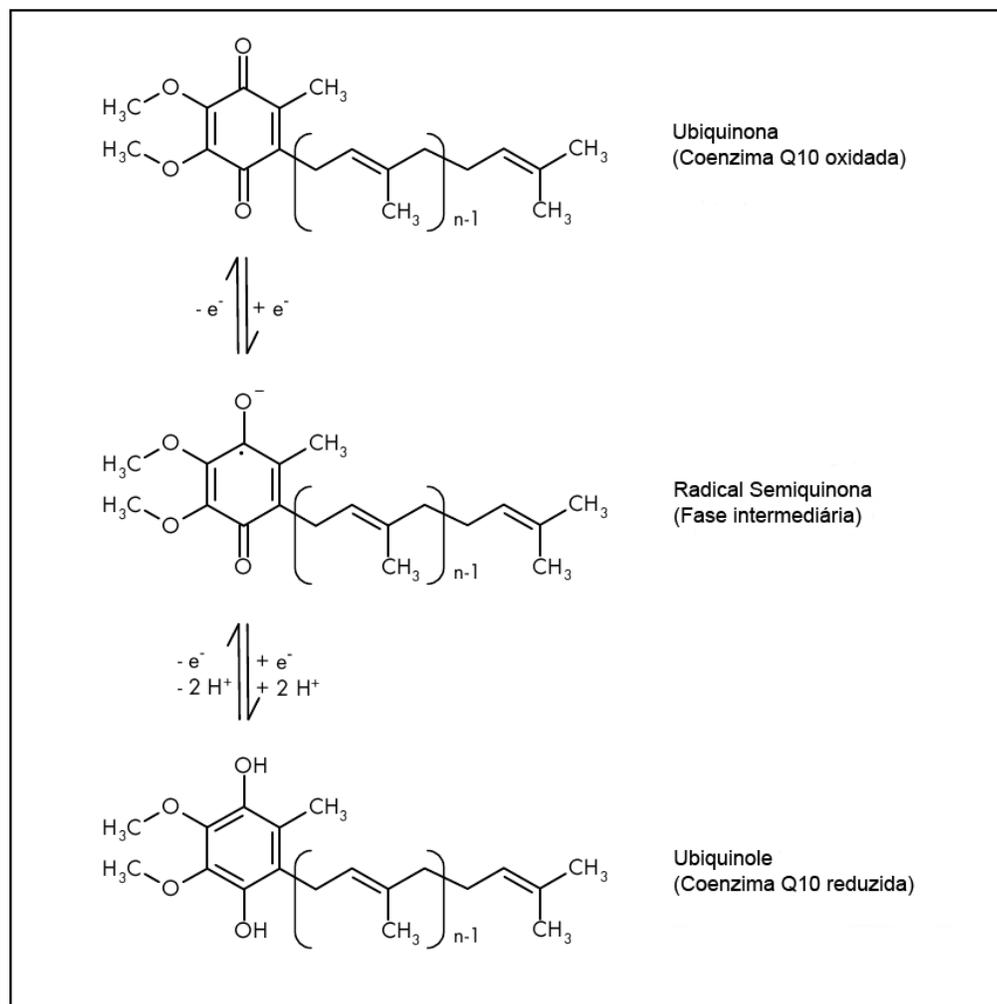


Figura 1 - Transferência de elétrons pela Coenzima Q10 (n=10)

Devido a estas propriedades químicas, a coenzima Q10 tem duas principais funções bioquímicas no organismo humano:

A produção de energia na forma de ATP (cadeia respiratória)

A transferência de elétrons e prótons de oxigênio ocorre em estágios durante a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias das células, através do qual o ATP é produzido como um equivalente de energia. As proteínas da membrana (complexos I a V), bem como a transferência de elétrons das coenzimas Q10 o citocromo c estão envolvidos neste processo. A Coenzima Q10 transporta elétrons entre complexos I / II e III.

Formação e degradação de espécies reativas de oxigênio

O radical ubiquinona pode conduzir à formação de espécies reativas de oxigênio que danificam as células e desempenham um papel no desenvolvimento de doenças degenerativas. Paradoxalmente ela também fornece proteção contra estes fatores, interceptando os radicais na reação inversa e, assim, inibindo a peroxidação de lipídios, entre outras coisas.

Coenzima Q10 se origina da síntese endógena, e a partir da ingestão de alimentos. Deficiência de ubiquinona pode, portanto, ter duas causas: uma dieta com falta de coenzima Q10 ou uma diminuição da síntese do corpo de coenzima Q10. Uma baixa oferta de coenzima Q10 pode ser causada, por exemplo, por uma dieta de baixa gordura, dieta vegetariana desequilibrada ou má absorção de gordura. Síntese endógena inadequada de coenzima Q10 pode resultar de uma deficiência nos precursores de ubiquinona, tais como fenilalanina, niacina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico e vitaminas B6 e B12, ou de várias drogas, tais como as estatinas (reduz os níveis de colesterol). A síntese também é reduzida no processo de envelhecimento, o que resulta em níveis mais baixos de coenzima Q10 nos idosos.

A deficiência de coenzima Q10 pode levar a danos no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, causando, assim, um aumento da produção de radicais de oxigênio. Isso resulta em um aumento do stress oxidativo no organismo, o que pode levar a um aumento da peroxidação de lipídios e é vista como a causa de várias doenças tais como doenças cardiovasculares, cancro e doenças neuro-degenerativas como Morbus Parkinson. A suplementação da dieta com coenzima Q10 levou a um risco reduzido de doenças cardiovasculares em vários estudos.

Para ser capaz de diagnosticar uma falta de coenzima Q10 a tempo, o controle regular do nível de coenzima Q10 no sangue é importante. Isto é especialmente importante para os pacientes tratados com as estatinas acima mencionados para assegurar que uma deficiência pode ser tratada de uma só vez. O nível no plasma também deve ser monitorizado regularmente durante a suplementação nutricional de coenzima Q10 para garantir o sucesso terapêutico e evitar sobredosagem.

Uso específico:

O kit de reagentes da Chromsystems para Coenzima Q10 em soro/plasma/sangue total é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para determinação quantitativa da coenzima Q10 (ubiquinona) em amostras de soro, plasma e sangue total de pacientes através de cromatografia de alta eficiência (HPLC). É utilizada como teste de monitoramento dos níveis de coenzima Q10 em pacientes.

Princípio do kit reagente:

O Kit reagente permite o monitoramento específico dos níveis de Coenzima 10. A Coenzima Q10 total é determinada na sua forma oxidada, ubiquinona. A Coenzima Q10 reduzida, ubiquinole, é muito sensível a oxidação e sua oxidação se inicia imediatamente após a coleta do sangue. Por isso, não é possível medir a concentração fisiológica real de ambas as formas. Durante a preparação da amostra, os vestígios restantes de ubiquinole são oxidados e coenzima Q10 total, como ubiquinona, é separada a partir de proteínas lipofílicas. A solução resultante é então limpa e concentrada por extração em fase sólida. A inclusão de um padrão interno minimiza as variações analíticas. A extração em fase sólida permite concentrar coenzima Q10 sem uma etapa demorada de evaporação. Deve ser evitada a utilização de hexano pelo uso de reagentes de precipitação apropriados. Hexano é prejudicial para os nervos e os pulmões e, portanto, deve ser evitado, se possível, [4].

3 Sistema HPLC

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no capítulo 10

3.1 Parâmetros do equipamento

A análise de coenzima Q10 requer um sistema simples, isocrático, com bomba de HPIC, injetor e detector UV. Não utilize vácuo ou qualquer outro tipo de desgaseificação, pois isso pode resultar em alterações na fase móvel. Para impedir isto, a fase móvel deve ser mantida tampada, mesmo durante a utilização.

O uso de um forno de coluna termostaticada vai evitar variações de temperatura e garantir uma ótima estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	50 µl,
Tempo de corrida analítica:	14 minutos
Razão de Fluxo	2.5 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (Aproximadamente 25°C)
Detector de UV:	$\lambda = 275 \text{ nm}$
Solução de limpeza da agulha (injetor):	2-Propanol

3.2 Coluna HPLC

A coluna HPIC para análise de coenzima Q10 é fornecida equilibrada 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 2,5 ml/min é de cerca de 80 bar, valor que pode elevar com a idade/uso da coluna. Para prevenir o aumento da contrapressão da coluna, recomenda-se injetar água destilada após cada série de cerca de 20 amostras. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância.

Nota:

Para prolongar a vida da coluna, uma pré-coluna (artigo 18001 e 18068) é absolutamente necessária. No caso de deterioração da separação cromatográfica ou uma contrapressão da coluna muito alta, trocar o cartucho da pré-coluna. Para prolongar a vida da pré-coluna, um pré-filtro PEEK (ordem no. 15009 e 15010) também deve ser usado.

Antes de iniciar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna HPIC, lavar o sistema com aproximadamente 50 ml água destilada. Injetar água destilada várias vezes para limpar o injetor;
2. Rinsar o sistema com aproximadamente 30 ml de fase móvel com razão de fluxo de 2,5 ml/min. Injetar a fase móvel várias vezes.
3. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 2,5 ml/min por aproximadamente 15-20 minutos, até que a linha de base esteja estabilizada.
4. Injetar repetidamente o calibrador preparado, até que dois cromatogramas sucessivos apresentem picos com tempo de retenção e área/altura praticamente idênticos.
5. Depois disso, a fase móvel pode ser recirculada.

3.3 Desligamento

Para períodos de desuso superiores há 3 dias, bombear fase móvel numa razão de fluxo baixa (0,2 ml/min) pelo sistema. A coluna HPIC permanece conectada, mas, para aumentar o tempo de vida da lâmpada, o detector deve ser desligado. Para longos períodos de desuso, a coluna HPIC 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 HPIC limpo com cerca de 50 ml de H₂O/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção da coenzima Q10 e do padrão interno com razão de fluxo de 2.5 ml/min:

Substância	Tempo de retenção (min. aproximadamente)
Coenzima Q10	11.2
Padrão Interno	6.9

A separação cromatográfica dura aproximadamente 14 min (veja cromatogramas no capítulo 13). 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 capítulo 10

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

Plasma, soro ou sangue total podem ser utilizados para análise. As amostras devem ser mantidas frescas no transporte. A validade é de até 4 dias quando armazenadas entre +2 e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento, armazenar abaixo de -18°C. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

5.2 Reconstituição do plasma calibrador

O calibrador (no. ordem 68003) 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 HPIC. **Para reconstituir o plasma 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 a exposição direta da luz solar. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

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

Estabilidade do calibrador reconstituído:

O calibrador reconstituído é estável por até 1 semana quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até 3 meses) alíquotar e armazenar ultracongelado (abaixo de -18 °C). Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

5.3 Reconstituição do controle em plasma

O controle em plasma (artigo 0091), é submetido a todo o processo de preparo das amostras, do mesmo modo que as amostras de pacientes. O controle é incluído em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir o plasma controle liofilizado, pipetar exatamente 2,0 ml de água destilada no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

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

Estabilidade do controle reconstituído:

O controle reconstituído é estável por até 1 semana quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até 3 meses) armazenar ultracongelado (abaixo de -18 °C). Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

5.4 Procedimento de preparo das amostras em plasma/soro

A determinação da coenzima Q10 como um biomarcador para o stress oxidativo requer recalibração periódica de todo o sistema de reação. Isto aplica-se em particular quando novos reagentes são usados em combinação com reagentes mais velhos na medição.

Reconstituir o plasma calibrador e cada plasma controle com 2,0 ml de água destilada (capítulo 5.2 e 5.3).

Precipitação:

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

Extração em fase sólida:

7. Aplicar o sobrenadante completo **obtido a partir da etapa de precipitação a uma coluna de amostra limpa identificada e retirar rapidamente por centrifugação (2 min a 700 xg) ou sucção, descartar efluentes.
8. Passar 500 µl de tampão de lavagem 1 através da coluna por centrifugação (1 min a 700 xg) ou de sucção, descartar os efluentes.
9. Passar 160 µl de tampão de lavagem 2 através da coluna por centrifugação (2 minutos a 700 xg) ou de sucção, descartar os efluentes.
10. Trocar o frasco de coleta, aplicar 250 µl tampão de eluição à coluna, e fluir completamente por centrifugação (2 min a 700 x g) ou por sucção.
11. Injetar 50 µl do eluato no sistema HPIC.

** Em alguns casos, pode ser que o sobrenadante seja composto por duas fases, resultando em uma solução turva na ponta. Neste caso, é essencial colocar as duas fases na coluna de amostra.

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

Importante:

- Adicione reagente de precipitação 2 após cinco minutos de centrifugação!
- Use apenas frascos de vidro para coleta do eluato!
- Se for necessário realizar o procedimento de limpeza da amostra em uma capela.

5.5 Procedimento de preparo das amostras em sangue total

A determinação da coenzima Q10 como um biomarcador para o stress oxidativo requer recalibração periódica de todo o sistema de reação. Isto aplica-se em particular quando novos reagentes são usados em combinação com reagentes mais velhos na medição.

Precipitação:

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

Extração em fase sólida:

8. Aplicar o sobrenadante completo **obtido a partir da etapa de precipitação a uma coluna de amostra limpa identificada e retirar rapidamente por centrifugação (2 min a 700 xg) ou sucção, descartar efluentes.
9. Passar 500 µl de tampão de lavagem 1 através da coluna por centrifugação (1 min a 700 xg) ou de sucção, descartar os efluentes.
10. Passar 160 µl de tampão de lavagem 2 através da coluna por centrifugação (2 minutos a 700 xg) ou de sucção, descartar os efluentes.
11. Trocar o frasco de coleta, aplicar 250 µl tampão de eluição à coluna, e fluir completamente por centrifugação (2 min a 700 x g) ou por sucção.
12. Injetar 50 µl do eluato no sistema HPIC.

** Em alguns casos, pode ser que o sobrenadante seja composto por duas fases, resultando em uma solução turva na ponta. Neste caso, é essencial colocar as duas fases na coluna de amostra. As colunas de amostras ficando vermelho não tem nenhuma influência sobre a qualidade ou a validade do fluido.

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

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

Importante:

- Adicione reagente de precipitação 2 após cinco minutos de centrifugação!
- Use apenas frascos de vidro para coleta do eluato!
- Se for necessário realizar o procedimento de limpeza da amostra em uma capela.

5.6 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas, são estáveis em temperatura ambiente por 24 horas. Por períodos maiores, armazenar abaixo de -18 °C.

Durante o armazenamento a temperaturas inferiores a 4 °C cristais podem formar-se no eluato. Estes não re-dissolvem quando a amostra é aquecida. Isso não afeta os resultados analíticos para estas amostras. No entanto, tome cuidado para não injetar cristais no sistema de HPIC.

6 Resultados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

A concentração atual da coenzima Q10 depende do 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 isso, injetar 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). Entrar com o tempo de retenção obtido e a concentração do calibrador (veja folheto de informações) na tabela de análise.

N° do Pico	Analito	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)	Concentração [µg/l]
1	Coenzima Q10	11.2	Veja folheto de informações
2	Padrão Interno	6.9	1

Para assegurar que nem a calibração nem as condições do HPIC (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 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 capítulo 13) 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 entrada como “1”.

7 Controle de Qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Controle Chromsystems em plasma (artigo 0091). Caso a análise desse controle mostre resultados fora do intervalo fornecido nos folhetos de informação, o sistema deve ser avaliado, e, se necessário, recalibrado.

8 Valores de referência

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

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

9 Fatores de Conversão

Substância	µg/l para nmol/l	nmol/l para µg/l
Coenzima Q10	x 1,158	x 0.863

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 1	+18 a +30°C
Reagente de Precipitação 2	+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 de Amostras	+18 a +30°C
Padrão de Calibração em Plasma	abaixo de -18 °C
Controle em Plasma, Bi-level (I + II)	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.

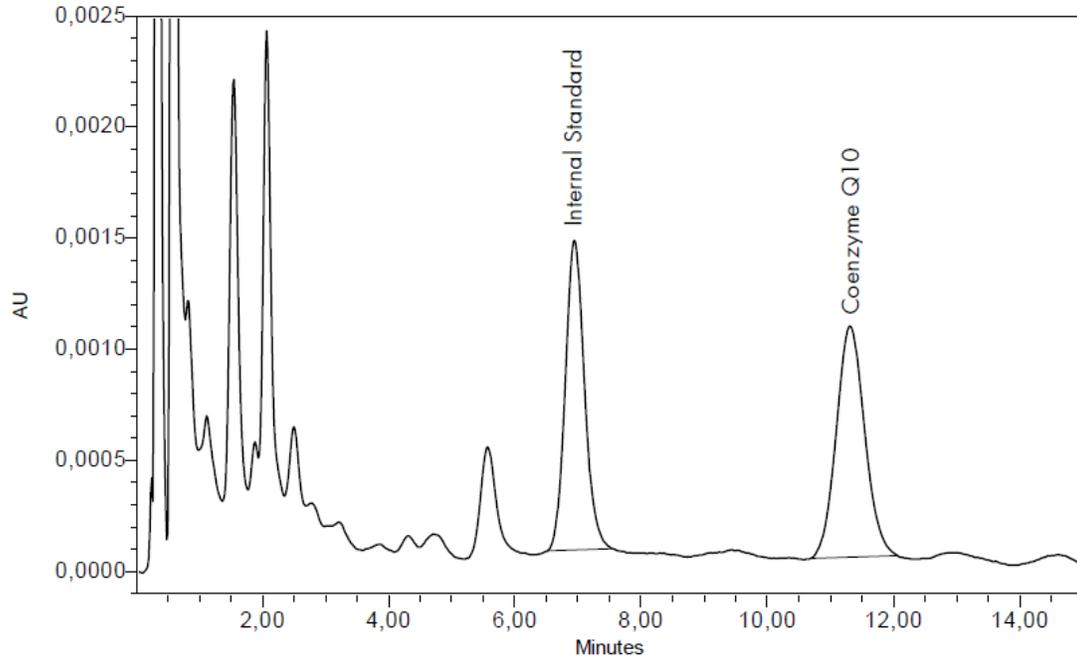
11 Descarte de resíduos

A Fase Móvel, Padrão Interno, Tampão de lavagem 1, Tampão de lavagem 2 e o Tampão de Eluição **contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio.**

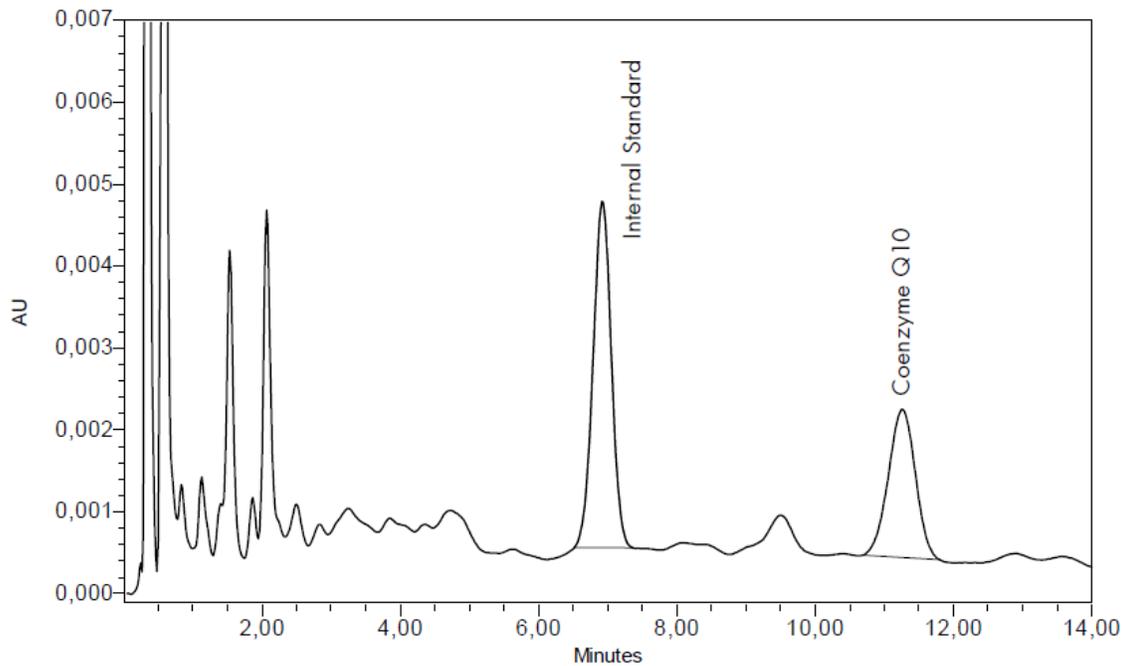
O Reagente de Precipitação 1, o Reagente de Precipitação 2 e os resíduos dos espécimes preparados contem solventes orgânicos e halogênios. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânico com halogênio. As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento central 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 permitido somente a pessoas autorizadas.

12 Exemplos de cromatogramas

12.1 Cromatograma de um calibrador em plasma

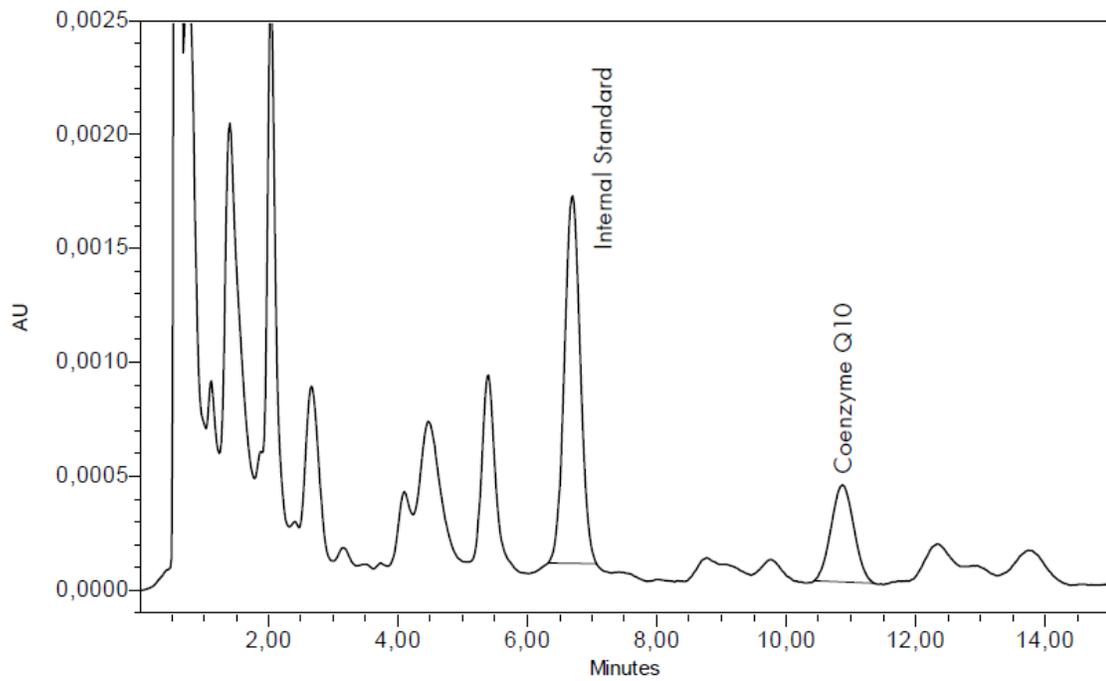


12.2 Cromatograma de um controle em plasma



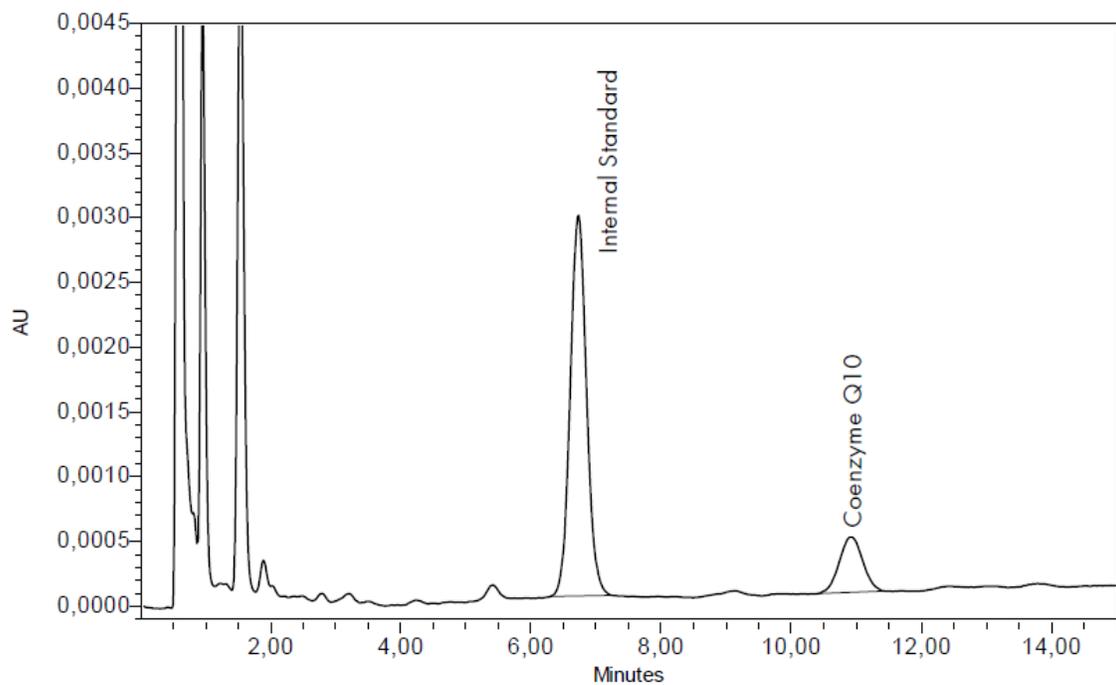
Coenzima Q10: 700 µg/l (810 nmol/l)

12.3 Cromatograma de uma amostra em soro



Coenzima Q10: 400 µg/l (463 nmol/l)

12.4 Cromatograma de uma amostra em sangue total



Coenzima Q10: 341 µg/l (395 nmol/l)

13 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Picos interferentes	Injetor contaminado	Rinsar com 30 ml de água grau HPIC e 2-propanol cada e injetar água e 2-propanol várias vezes (aproximadamente 10 vezes)
	Coluna UHPIC contaminada	Rinsar com 30 ml de água grau HPIC e 2-propanol cada e injetar água e 2-propanol várias vezes (aproximadamente 10 vezes)
	Frascos do amostrador automático contaminados	Utilizar novos frascos ou limpá-los com metanol
	Ar no sistema	Purgar o sistema HPIC
Alargamento de picos, cauda	Pré-Coluna velha	Substituir pré-coluna
	Coluna HPIC velha	Substituir coluna
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 de temperatura	Usar forno de coluna
linha de base instável	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPIC
	Bomba do HPIC	Verificar a bomba (ar, selos)
Picos duplicados	Ar no sistema	Purgar o sistema HPIC
	Cela do detector contaminada	limpar a cela
Sem picos	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna HPIC	Substituir a coluna
	Pré-coluna ressecada	Colocar a pré-coluna em metanol por aproximadamente 1 hora.
Sensibilidade diminuindo	Vazamento no sistema	Verificar o injetor
	lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
Mudanças no tempo de retenção	Cela do detector contaminada	limpar a cela
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
Sem sinal	Razão de fluxo instável pulsação da bomba	Avaliar bomba do HPIC, ajustar razão de fluxo
	Sistema não está equilibrado	Bombear a fase móvel no sistema por aproximadamente 15 minutos; 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 se necessário

16 literatura

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

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 68001, 68002) 	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. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Mantenha distante de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Use equipamentos elétricos/ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 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 para um centro de intoxicação ou médico caso haja mal-estar. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.
Padrão Interno (artigo 68004) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. P210 Mantenha distante de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.
Reagente de Precipitação 1 (artigo 68005) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H314 Causa danos severos a pele e aos olhos. H335-H336 Pode causar irritação respiratória. Pode causar sonolência e tontura. H411 Tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nocivos a longo prazo no ambiente aquático. 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. P273 Evite descarte no meio ambiente. P305+P351+P338 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

	<p>médico imediatamente, de preferência levar esse manual. P301+P330+P331 Em caso de ingestão: lave a boca. Não induza o vômito.</p>
Produto	Risco
<p>Reagente de Precipitação 2 (artigo 68006)</p>    	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H314 Causa danos severos a pele e aos olhos. H335-H336 Pode causar irritação respiratória. Pode causar sonolência e tontura. H410 Altamente tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nocivos a longo prazo no ambiente aquático.</p> <p>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. P273 Evite descarte no meio ambiente. P305+P351+P338 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 esse manual. P301+P330+P331 Em caso de ingestão: lave a boca. Não induza o vômito.</p>
<p>Tampão de lavagem 1 (artigo 68007)</p>   	<p>Perigo</p> <p>H226 Líquido e vapor inflamáveis. H301+H311+H311 Tóxico se ingerido, inalado ou em contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>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+P310 Em caso de ingestão: ligue para um centro de intoxicação ou médico caso haja mal-estar. 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.</p>
<p>Tampão de lavagem 2 (artigo 68009)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H226 Líquido e vapor inflamáveis. H301+H311+H311 Tóxico se ingerido, inalado ou em contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>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.</p>

	<p>P301+P310 Em caso de ingestão: ligue para um centro de intoxicação ou médico caso haja mal-estar. 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.</p>
Produto	Risco
<p>Reagente de Eluição (artigo 68010)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H319 Causa irritação séria aos olhos. H336 Pode causar sonolência e tontura.</p> <p>P210 Mantenha distante de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P233 Mantenha o frasco bem fechado. P305+P351+P338 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.</p>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Européia: Padrão de calibração em plasma (artigo 68003) Controles em plasma (artigo 0091, 0092, 0093)</p>	

Apêndice II: Cálculo Manual

Para o cálculo manual os seguintes dados são necessários:

- Área ou altura do pico da substância A no cromatograma da amostra = A_{Amostra}
- Área ou altura do pico da substância A no cromatograma do calibrador = $A_{\text{Calibrador}}$
- Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{Amostra}
- Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = $IS_{\text{Calibrador}}$
- Concentração C da substância A no calibrador = $C_{\text{Calibrador}}$

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

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

Apêndice III: Validação

Para checar a linearidade e validar o método, amostras de plasma foram acrescentadas de quantidades definidas de coenzima Q10 (ubiquinona). Alíquotas múltiplas dessas amostras foram submetidas ao procedimento de preparo descrito neste manual.

Recuperação:

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

Analito	Recuperação [%]
Coenzima Q10	80
Padrão Interno	89

Linearidade e limite de quantificação:

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

	limite de quantificação* (µg/l)	Faixa linear (µg/l)
Coenzima Q10	20	25000

*O limite de quantificação depende do detector utilizado!

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada pela média de múltiplos preparos (n=10) e determinação da concentração de coenzima Q10 de uma mesma amostra em 3 diferentes concentrações:

	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/l)		
	n= 10		
Coenzima Q10	2.6 (679)	4.6 (1013)	4.8 (1348)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n=100) e determinação da concentração de coenzima Q10 em *pool* de plasma em 10 diferentes séries de testes.

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

Apêndice IV: Declaração de Conformidade

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

Product name: **Coenzyme Q₁₀ in Serum/Plasma/Whole Blood**
Controls: **Coenzyme Q₁₀ Plasma Control**

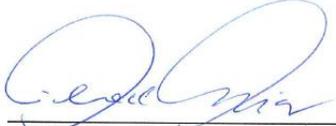
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

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 980,
EN ISO 23640, EN 13641

Notified body: -

Munich, June 04, 2012


Michael Meier
Managing Director

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