

VITAMIN C IN PLASMA/SERUM HPLC (VITAMINA C EM PLASMA/SORO – HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina C em Soro/Plasma por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
65065	Kit Reagente para Análise de Vitamina C em Soro/Plasma (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina C em soro/plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit da Chromsystems é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser utilizada em laboratórios de análises clínicas para a determinação quantitativa de vitamina C em amostras de plasma ou soro de pacientes que precisem ter seus níveis monitorados.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

Este kit permite a determinação cromatográfica confiável de vitamina C usando um simples sistema de HPLC isocrático com detecção UV. Os interferentes presentes na amostra são eliminados por uma eficiente etapa de precipitação das proteínas com simultânea estabilização da Vitamina C.

REAGENTES

Componentes e Composição:

Reagente	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de EDTA, carbonato de potássio dihidrogênio e Ácido fosfórico	1 x 1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa contendo: ácido perclórico; dietilenotriamina penta(ácido metileno fosfórico); cloreto de hidrogênio	1 x 10 mL
Frascos de reação (âmbar) (Reaction vials)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada nos rótulos, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

Artigo	Produto	Temperatura
65001	Fase móvel	+18 a +30°C
65044	Padrão Interno	+2 a +8 °C

Após abertura dos frascos os reagentes permanecem estáveis por até 1 ano, mas não devem exceder a validade indicada nos rótulos.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

O Padrão Interno contém ácido forte. A fase móvel e os resíduos de preparação das amostras contêm ácidos. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas. Descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 65100). Padrão de Calibração de Vitamina C em Plasma liofilizado (Chromsystems art. 65003). Controle de Vitamina C em Plasma Bi-Nível (I+II) (Chromsystems art. 0074). Água tipo I ou grau HPLC. Centrífuga para microtubos. Material geral de laboratório.

AMOSTRAS

Plasma fresco coletado em heparina de lítio, heparina de sódio, ou soro são utilizados para a análise. Outros sistemas de coleta de sangue resultam em menor estabilidade da vitamina C.

Estabilidade da amostra:

A vitamina C no plasma em heparina é estável como se segue.

Estabilidade das amostras de pacientes:

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento
Abaixo de -18°C	2 dias
Abaixo de -70°C	14 dias

Para minimizar a oxidação da vitamina C, a amostra deve ser centrifugada o mais rápido possível após a coleta. As amostras devem ser transportadas congeladas e imediatamente submetidas ao preparo de amostras após o descongelamento.

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

Atenção: Não usar plasma hemolisado porque os valores medidos podem ser muito baixos.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):

As amostras preparadas (eluatos) para análise podem ser mantidas conforme abaixo:

Tempo de armazenamento das amostras preparadas:

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	24 horas	Frasco de vidro bem fechado e com proteção à luz
+2 a +8 °C	1 semana	Frasco de vidro bem fechado e com proteção à luz
Abaixo de -18°C	6 semanas	Frasco de vidro bem fechado e com proteção à luz

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 20µL, (é recomendado o uso de amostrador refrigerado)
Tempo de corrida	aproximadamente 5 min
Fluxo:	1,0 a 1,5 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector UV:	Comprimento de onda de 245 nm
Solução de lavagem do injetor:	Água

Procedimento de preparo de amostras:

Utilizar os frascos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição da luz ambiente.

1. Pipetar 100 µl de amostra (ou calibrador/controles) em um frasco de reação fornecido.
2. Adicionar 100 µl de Padrão Interno (IS) e agitar por 30 segundos (vortex).
3. Centrifugar por 5 min a pelo menos 13000 g.
4. Injetar 20µl do sobrenadante no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Vitamina C	2,2
Padrão Interno	2,7

CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{Amostra}

Área ou altura do pico do analito 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 do analito A no calibrador = $C_{\text{Calibrador}}$

* A concentração do analito no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno

é adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser considerada como "1" para fins de cálculo.

Fatores de conversão:

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

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
65003	Padrão de Calibração de Vitamina C em Plasma (liofiliz.)	5 x 0,5mL
0074	Controle de Vitamina C em Plasma, Bi-Nível (I+II)	2 x 5 x 0,5mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

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

Linearidade / Limite de quantificação:

Analito (Matriz)	Limite de quantificação [mg/L]	Faixa linear de até pelo menos [mg/L]
Vitamina C (Plasma)	0.4	100
Vitamina C (Soro)	0.4	100

Precisão intra-ensaio:

Analito (Matriz)	Coeficiente de variação [%] (concentração em mg/L)		
	n=10	n=10	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:

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

Devido à baixa estabilidade da vitamina C em soro, a determinação da precisão inter-ensaio foi possível somente a uma extensão limitada.

VALORES DE REFERÊNCIA

Analito	Varição referência 1 [1]	Varição referência 2 [5]
Vitamina C	4,6 - 14,9 mg/L (26,1 - 84,6 µmol/L)	4,0 - 15,0 mg/L (23 - 85 µmol/L)

Um resumo dos valores de referência associados à idade e maiores detalhes sobre variações de referência podem ser encontrados na literatura [6].

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características de sua população analisada.

INTERFERENTES

As seguintes drogas comumente usadas foram testadas como interferentes:

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, ampicilina, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, bosiprolol, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, dexametasona, Diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, disopiramide, enalaprilato, eritromicina,

furosemda, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, dinitrato de isossorbida, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, metformina, meticilina, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, ácido micofecólico, ácido glucuronídeo micofenólico, N-acetilprocainamida, nadolol, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, propranolol, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol, ácido salicílico, estreptomicina, sulfametoxazol, tramadol, triamterene, trimetoprim, ácido valpróico, vancomicina e verapamil.

Para a concentração terapêutica mais alta, a acetilcisteína interfere com o padrão interno e gera concentrações de vitamina C que são aproximadamente 30% menores. Esta interferência pode ser detectada por um segundo pico em frente ao pico do padrão interno. Avalie essas amostras para essa interferência com a exclusão do padrão interno.

Todas as outras substâncias examinadas tiveram influência negligenciável nos resultados quantitativos (desvio \leq 15%).

LITERATURA

1. Lee W, Roberts SM, Labbe RF, (1997) Clinical Chemistry 43(1): 154-157.
2. Greiling H, Gressner AM (Hrsg), Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1995)
3. Nuhn p, Naturstoffchemie, Mikrobielle, pflanzlich und tierische Naturstoffe. 2. Auflage, 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

Símbolos Usados



Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ

Cep: 24020-112

CNPJ: 02.220.795/0001-79

MS – nº 10350840140

SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

www.biosys.com.br