

ONE STEP VITAMINS A/E IN SERUM/PLASMA - UHPLC
(Vitaminas A e E em Soro/Plasma por UHPLC, em etapa única)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* em etapa única, das Vitaminas A e E em Soro/Plasma por UHPLC.

Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

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

| Artigo | Apresentação |
|-------------|---|
| 34900/UHPLC | Kit Reagente para Análise de Vitaminas A/E em Soro/Plasma em etapa única, usando Tubos de Reação pre-mix, 1000 análises |

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções One Step Vitamins A/E in Serum/Plasma - UHPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a determinação simultânea das vitaminas A e E em soro ou plasma em sistema UHPLC isocrático com detecção UV, injetor e forno para coluna, auxiliando no diagnóstico das insuficiências e deficiências destas vitaminas, bem como, no acompanhamento do tratamento.

MÉTODO

Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

A preparação rápida e fácil da amostra consiste em um passo de precipitação, seguida da análise do sobrenadante em sistema UHPLC-UV.

REAGENTES

Componentes e Composições:

| Componente | Composição | Apresentação |
|--|------------------------|----------------|
| Fase móvel (Mobile Phase) | Solução metanólica | 2 x 500 mL |
| Tubos de Reação pre-mix (Pre-mixed Reaction Tubes) | Solução de propan-2-ol | 10 x 100 peças |

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenamento dos reagentes do kit.

| Componente | Armazenamento |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Fase móvel | Temperatura ambiente (18° a 30°C) |
| Tubos de Reação pre-mix | 2°- 8°C |

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Por favor, consulte a ficha de segurança dos reagentes e tome as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e 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

A Fase Móvel e os resíduos das amostras preparadas **contêm solventes orgânicos** e devem ser descartados como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Tubos de reação pre-mix: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Cartucho de pré-coluna UHPLC (Chromsystems art. 19034)
Vitamins A/E Serum Calibration Standard (Chromsystems art. 34004)
Vitamins A/E Serum Control, Bi-Level (I+II) (Chromsystems art. 0032)
Centrífuga para microtubos.
Água grau HPLC.
Metanol PA.
Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

A amostra pode ser soro ou plasma. O sangue é coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A amostra deve ser extraída com garroteamento leve e cuidado para prevenir a hemólise.

Estabilidade da amostra: Após a centrifugação o soro/plasma obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado em temperatura < -18 °C. Proteger a amostra da luz.

Estabilidade das amostras preparadas (elutos): Preparadas como descrito, as amostras são estáveis protegidas da luz em temperatura ambiente por 24 horas ou refrigeradas entre 2° a 8°C por até 48 horas.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Sampler: volume de injeção 5 µL, tempo de corrida analítica 3.5 min. Compartimento protegido da luz. Sem refrigeração.

Razão de fluxo: 0,60 mL/min.

Temperatura da coluna: temperatura ambiente (35°C)

Detector UV programável: iniciar em λ_{max} = 325 nm, após 1,30 min. mudar para 295 nm.

Limpeza do injetor: metanol

Procedimento de Preparo das Amostras:

1. Pipetar em um tubo de reação pré-mix previamente identificado 100 µL plasma/soro (ou controle/calibrador reconstituído)
2. Agitar em vórtex por 30 segundos
3. Centrifugar por pelo menos 10 minutos a 9000 x g
4. Injetar 5 µL do sobrenadante no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

| Substância | Tempo de Retenção (min. aproximadamente) |
|----------------|--|
| Vitamina A | 0,72 |
| Padrão Interno | 1,56 |
| Vitamina E | 2,86 |

CÁLCULOS

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

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 = $C_{\text{Calibrador}}$

Fatores de conversão

| Analito | mg/L para µmol/L | µmol/L para mg/L |
|------------|------------------|------------------|
| Vitamina A | x 3,49 | x 0,286 |
| Vitamina E | x 2,32 | x 0,431 |

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises:

| Artigo | Produto | Apresentação |
|--------|--|--------------|
| 34004 | Serum Calibration Standard (lyoph) | 5 x 1mL |
| 0032 | Vitamins A/E Serum Control, Level I + II | 2 x 5 x 2 mL |

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

| Analito | Soro | Plasma |
|----------------|------|--------|
| Vitamina A | 104% | 106% |
| Vitamina E | 101% | 99% |
| Padrão Interno | 100% | 98% |

Linearidade e limite de quantificação:

| Analito | Limite de quantificação aproximado (mg/L)* | Limite máximo de linearidade (mg/L) |
|------------|--|-------------------------------------|
| Vitamina A | 0,005 | 4,50 |
| Vitamina E | 0,100 | 38,0 |

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

Em soro:

| Analito | Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L) | | |
|------------|---|------------|------------|
| | n = 10 | | |
| Vitamina A | 0.6 (0.49) | 0.8 (0.82) | 1.3 (2.27) |
| Vitamina E | 0.5 (14.1) | 0.5 (18.2) | 1.4 (30.1) |

Em plasma:

| Analito | Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L) | | |
|------------|---|------------|------------|
| | n = 10 | | |
| Vitamina A | 3.1 (0.78) | 2.1 (1.20) | 2.4 (1.65) |
| Vitamina E | 1.6 (12.1) | 1.4 (18.8) | 1.4 (25.5) |

Precisão inter-ensaio:

Em soro:

| Analito | Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L) | |
|------------|---|------------|
| | n = 20 | |
| Vitamina A | 3.1 (0.50) | 2.9 (1.08) |
| Vitamina E | 3.0 (14.7) | 2.3 (29.3) |

Em plasma:

| Analito | Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L) | |
|------------|---|------------|
| | n = 20 | |
| Vitamina A | 3.3 (0.55) | 2.0 (1.18) |
| Vitamina E | 2.5 (13.3) | 2.1 (25.6) |

VALORES DE REFERÊNCIA

Vitamina A

| Detalhes | Grupo de indivíduos | Valor de Referência |
|------------------------|------------------------|--|
| Retinol em soro | Adultos | 1.05-2.45 µmol/L 0.3-0.7 mg/L |
| Retinol em soro/plasma | Adultos | 1.0-2.1 µmol/L 0.3-0.6 mg/L |
| Retinol em soro/plasma | Adolescentes | 0.66-1.7 µmol/L 0.2-0.5 mg/L |
| Retinol em soro/plasma | Crianças (até 10 anos) | 0.53-1.4 µmol/L 0.15-0.4 mg/L |
| Retinol em soro/plasma | Crianças (até 1 ano) | 0.35-1.0 µmol/L 0.1-0.3 mg/L |
| Retinol em soro/plasma | Recém-nascidos | - |
| Limite tóxico | - | A partir de 1.4 mg/L |
| Deficiência | Adultos | Inicial - 0.1-0.19 mg/L Grave - <0.1 mg/L |

Vitamina E

| Detalhes | Grupo de indivíduos | Valor de Referência |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| D-α-tocoferol em soro | Adultos | 11.6-46.4 µmol/L 5.0-20.0 mg/L |
| Vitamina E em soro/plasma | Adultos | 12-42 µmol/L 5-18 mg/L |
| Vitamina E em soro/plasma | Adolescente (13 - 19 anos) | 14-23 µmol/L 6-10 mg/L |
| Vitamina E em soro/plasma | Crianças (1 - 12 anos) | 7-21 µmol/L 3-9 mg/L |
| Vitamina E em soro/plasma | Bebes prematuros | 2.3-11.6 µmol/L 1-5 mg/L |
| D-α-tocoferol em soro | Adultos | 22 µmol/L |
| Deficiência | Adultos | <11.6 µmol/L < 5 mg/L |
| Limite padrão mínimo | Adultos | 11.6 µmol/L |

LITERATURA

1. Vuilleumier, J. P., Keller, H.E., Gysel, D., Hunziker, F.: Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Part I: The fat-soluble vitamins A and E, and β -carotene; Int. J. Vitam. Nutr. Res.; 53 (3), 265-272; 1983.
2. Reinards, R. in: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie; 3nd Ed., Verlag Schattauer Stuttgart/New York; 344-346; 1987.
3. Milne, D. B., Botnen, J.: Retinol, α -tocopherol, lycopene, and α - and β -carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography; Clin. Chem.; 32: 874-876; 1986.
4. Lehmann, J., Martin, H. L.: Improved direct determination of alpha- and gamma-tocopherols in plasma and platelets by liquid chromatography, with fluorescence detection; Clin. Chem.; 28: 1784-1787; 1982.
5. Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh; 1997.
6. Biesalski, J., Schrezenmeier, J., Weber, P., Weiß, H. E.: Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie; Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York; 1997.
7. Baltes, W.: Lebensmittelchemie; 2nd Ed., Springer Verlag Berlin; 1989.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munich, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de