

Vitamin B1 in whole blood and vitamin B6 in whole blood/plasma - UHPLC (VITAMINA B1 EM SANGUE TOTAL E VITAMINA B6 EM SANGUE TOTAL/PLASMA – UHPLC)

Para determinação quantitativa *in vitro* das Vitaminas B1 em sangue total e B6 em sangue total/plasma por UHPLC.

Somente diagnóstico de uso *in vitro*.

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

Artigo	Apresentação
52900/UHPLC	Kit Reagente para Análise de Vitaminas B1 em Sangue Total e Vitamina B6 em Sangue Total/Plasma, 1000 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções Vitamina B1 em Sangue Total e Vitamina B6 em Sangue Total/Plasma no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a determinação simultânea das vitaminas B1 em sangue total e B6 em sangue total ou plasma em sistema UHPLC com bomba binária, injetor e um detector de fluorescência programável, auxiliando no diagnóstico das insuficiências e deficiências destas vitaminas, bem como, no acompanhamento do tratamento.

MÉTODO

Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) com detector de fluorescência.

PRINCÍPIO

A preparação fácil da amostra consiste em dois passos de precipitação, seguida da análise do sobrenadante em sistema UHPLC.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel A (Mobile Phase)	Solução metanólica	1000 mL
Fase móvel B (Mobile Phase)	Solução metanólica	1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Água, piridina e azida sódica	10 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Ácido perclórico	10 x 30 mL
Tubos de Reação pre-mix (Pre-mixed Reaction Tubes)	Fosfato de Potássio dibásico e água	10 x 100 unidades
Reagente de Derivatização 1 (Derivatisation Reagent 1)	Hexacianoferrato de Potássio III	10 x 2 x 0,3 mL
Reagente de Derivatização 2 (Derivatisation Reagent 2)	Fosfato de Potássio dibásico e água	10 x 15 mL
Tampão de Estabilização (Stabilisation Buffer)	Propano-2-ol	10 x 10 mL
Frascos de Reação (Reaction vials)	-	10 x 100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM 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 armazenagem para os reagentes do kit.

Produto	Armazenamento
Fase móvel A	Temperatura ambiente (18-30°C)
Fase móvel B	Temperatura ambiente (18-30°C)
Padrão Interno	Temperatura ambiente (18-30°C)
Reagente de Precipitação	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tubos de Reação pre-mix	Temperatura ambiente (18-30°C)
Reagente de Derivatização 1	Temperatura ambiente (18-30°C)
Reagente de Derivatização 2	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de Estabilização	2 a 8 °C
Frascos de Reação	Temperatura ambiente (18-30°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 A e B: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso

Reagente de Precipitação: pronto para uso

Tubos de reação pre-mix: pronto para uso.

Tampão de estabilização: pronto para uso.

Mix de Derivatização:

Inicialmente deve-se reconstituir o conteúdo do frasco de Reagente de Derivatização 1 (artigo 52007) com exatamente 0,3 mL de água grau HPLC, em seguida misturar 50 µL do reagente reconstituído com 1,0 mL do Reagente de Derivatização 2 (artigo 52008). Proporção 1:20. Esta mistura está pronta para o uso na preparação das amostras.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Vitamins B1/B6 Whole Blood Calibration Standard (Chromsystems art. 36005)

Centrífuga para microtubos.

Água grau HPLC.

Metanol PA.

Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

A amostra pode ser sangue total 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 sangue total/plasma obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado em temperatura < -18 °C. Proteger a amostra da luz.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):

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:

Amostrador: volume de injeção 1.5-2.5µL, tempo de corrida analítica 2.5 min.,

Manter o compartimento protegido da luz.

Razão de fluxo: 1,5 mL/min.

Temperatura da coluna: temperatura ambiente (20 - 25°C)

Detector fluorescência: iniciar em λ_{max} = 320 nm, após 1 min. mudar para 435 nm.

Limpeza do injetor: água grau HPLC

Procedimento de Preparo das Amostras:

1. Pipetar em um tubo de reação pré-mix previamente identificado 200 µL sangue total/plasma (ou controle/calibrador reconstituído), 100 µL de Padrão Interno e 300 µL de Reagente de Precipitação
2. Agitar em vórtex por 30 segundos
3. Centrifugar por pelo menos 5 minutos a 9000 x g
4. Injetar 100 µL do mix de derivatização em um tubo de neutralização pré-mix previamente identificado
5. Adicionar 250 µL do sobrenadante e agitar brevemente. Não centrifugar o precipitado em desenvolvimento.
6. Incubar 25 min a 60±1°C (banho-maria)
7. Imediatamente após a incubação, adicionar 100 µL do Tampão de Estabilização e agitar brevemente.
8. Incubar por pelo menos 10 min entre + 2 e +8°C, então centrifugar por 2 min a 9.000 x g.
9. Transferir o sobrenadante para um frasco do amostrador automático (Autosampler) protegido da luz e injetar 1.5-2.5 µL do sistema UHPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Padrão Interno	0,51
Vitamina B6	0,72
Vitamina B1	1,56

CÁLCULOS

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

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 = $C_{\text{Calibrador}}$ (veja o folheto de informações)

Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Vitamina A	x 2,357	x 0,424
Vitamina E	x 4,046	x 0,247

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
0164	Vitamins B1/B6 Whole Blood Control, Bi-Level I + II	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Analito	Soro	Plasma	Soro
Vitamina B6	86%	92%	88%
Vitamina B1	101%	-	-
Padrão Interno	94%	96%	91%

Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação aproximado (µg/L)*	Limite máximo de linearidade (µg/L)
Vitamina B6	0,5	250
Vitamina B1	0,7	750

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

Em sangue total

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)		
	n = 10		
Vitamina B6	1.7 (11.1)	2.6 (38.7)	1.4 (13.1)
Vitamina B1	3.3 (23.8)	4.4 (101)	2.6 (39.6)

PLP (Vitamina B6) em plasma e soro:

Matriz	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)		
	n = 10		
Plasma	2.7 (10.3)	1.9 (42.4)	3.9 (16.3)
Soro	1.5 (8.22)	2.5 (47.2)	2.6 (18.0)

Precisão inter-ensaio:**Em sangue total:**

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)	
	n = 100	
Vitamina B6	3.4 (11.3)	5.4 (40.7)
Vitamina B1	4.0 (25.4)	4.9 (109)

PLP (Vitamina B6) em plasma e soro:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)	
	n = 100	
Vitamina A	2.8 (10.3)	2.9 (43.0)
Vitamina E	3.6 (7.75)	5.5 (44.6)

VALORES DE REFERÊNCIA

	[µg/L]	[nmol/L]
Vitamina B1 (TPP) em sangue total:	28 - 85	66.5 - 200
Vitamina B6 (PLP) em sangue total (EDTA):	8.7 - 27.2	35 - 110
Vitamina B6 (PLP) em EDTA-plasma:	3.6 - 18.0	15 - 73

LITERATURA

- Bertelsmann Stiftung (Hrsg). Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine - Klinische Aspekte und chemische Analyse, Verlag Bertelsmann Stiftung Gütersloh (1997).
- Isler O, Brubacher G, Ghisla S, Kräutler B. Vitamine II. 2. Aufl, Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1988).
- Greiling H, Gressner AM (Hrsg). Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer Verlag Stuttgart, (1987).
- Baltes W. Lebensmittelchemie. 2. Aufl, Springer Verlag Berlin (1989).
- Brönstrup A, Pietrzik K. (1996) *VitaMinSpur* 11: 85.
- Leklem JE. In: Leklem JE, Reynolds RD (eds) Clinical and physiological applications of vitamin B6. Current topics in nutrition and disease, vol 19: 3-28, Alan R. Liss Inc New York (1988).
- Reynolds TM, Brain A. (1992) A simple internally-standardised isocratic HPLC assay for vitamin B6 in human serum. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 15(5): 897-914.
- Tryfiates GP, Bishop RE, Murgo AJ. (1991) Vitamin B6 and cancer: a novel pyridoxal 5-phosphate conjugate in tumor cells and blood of cancer patients. *Anticancer Res* 11(3): 1281-4.
- Biesalski H, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H (Hrsg). Vitamine. Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1997).
- Yasuda K, Okuda K, Endo N, Ishiwatari Y, Ikeda R, Hayashi H, Yokozeki K, Kobayashi S, Irie Y. (1995) Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long-term hemodialysis: clinical and biochemical appraisal. *Gastroenterology* 109(4): 1295-300.
- Wilson RG, Davis RE. Clinical Chemistry of Vitamin B6. In: Schwartz, MK (ed.) *Advances in Clinical Chemistry*, vol 23: 1-68, Academic Press New York, London (1983).

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